D.J. Walters.

MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR
A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · R. STREBINGER - Wien
C. L. WILSON - Belfast · M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS
E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF
M. K. ZACHERL - Wien

1961
VIERTES HEFT
MIT 29 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 31. MAI 1961

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1961

Mikrochim. Acta

Die Zeitschrift

„Mikrochimica Acta"

erscheint ab 1957 zu einem festen Jahresbezugspreis. Im Jahre 1960 wird ein Band von etwa 1000 Seiten Umfang zum Jahresbezugspreis von S 732.—, DM 122.—, sfr. 124.90, $ 29.—, £ 10/7/6 erscheinen. Der Band setzt sich aus 6 Heften zusammen, die in Abständen von etwa 2 Monaten herausgegeben werden.

Zur Veröffentlichung gelangen Originalarbeiten aus dem Gebiet der allgemeinen und angewandten Mikrochemie in deutscher, englischer und französischer Sprache, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Die Reihenfolge der Veröffentlichung richtet sich im allgemeinen nach dem Datum des Eingangs der Manuskripte bei der Redaktion.

Für die Zeitschrift bestimmte Manuskripte aus USA. und Canada sind zu senden an:
Editor of „Mikrochimica Acta", Department of Chemistry, Queens College, Flushing, N. Y., USA. (Dr. A. A. Benedetti-Pichler)

Sonstige Manuskripte in englischer Sprache sind zu senden an:
Prof. C. L. Wilson, Department of Chemistry, The Queen's University, Belfast

Manuskripte in französischer Sprache sind zu senden an:
Prof. Clément Duval, Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'E. N. S. C. P., 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Manuskripte in deutscher Sprache sind zu senden an:
Prof. Dr. M. K. Zacherl, Wien, I., Mölkerbastei 5

Geschäftliche Mitteilungen sind zu richten an:
Springer-Verlag, Wien, I., Mölkerbastei 5
Fernsprecher: 63 96 14 Serie, Telegrammadresse: Springerbuch Wien

Grundsätzlich werden nur Arbeiten angenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

1961 Inhaltsverzeichnis 4. Heft

Seite

Mitsui, T., O. Yamamoto, and **K. Yoshikawa.** Silver Granules as an Absorbent of Halogens and Oxides of Sulphur 521

Mitsui, T., and **K. Yoshikawa.** Avoidance of the Weighing Problem Arising from Electrostatic Charge 527

Luis, P. Scheme for the Systematic Identification of Barium, Strontium and Calcium in Mixtures 529

Korkisch, J., and **G. E. Janauer.** On the Use of Azo Dyes for the Spectrophotometric Determination of Uranium and Thorium in Mixed Solvents 537

Hennart, Claude. Applications de la chélatométrie 543

Peters, K. Über den Nachweis und die Ausbreitung unwägbarer Aerosolteilchen 550

Stegemann, H., und **Gertrud Bernhard.** Die Trennung und Analyse von Aminosäuren im Ultramikro-Maßstab 555

Korkisch, J. Azofarbstoffe als Reagenzien zur spektrophotometrischen Bestimmung von Mikrogrammengen Molybdän 564

Dutt, N. K., and **A. Dutta Ahmed.** Dalzin (Diallyl-Dithio-Carbamido Hydrazine) as a Micro-Reagent. I. 571

Knobloch, W., F. Knobloch und **G. Mai.** Über einen neuen Mikroverbrennungsautomaten zur serienmäßigen C-, H- und N-Bestimmung 576

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Contribution from the Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

Silver Granules as an Absorbent of Halogens and Oxides of Sulphur

By

Tetsuo Mitsui, Osamu Yamamoto, and **Keikichi Yoshikawa**

With 4 Figures

(Received April 11, 1960)

It has been established that electrolytic silver wool absorbs halogens quantitatively when used in the microdetermination of halogens in organic compounds[1]. Subsequently silver wool, on account of its high relative capacity for halogens and oxides of sulphur[2,3], was recommended as an excellent absorbent for these substances in the determination of carbon-hydrogen.

It is true that the silver wool is superior to silver gauze or silver wire in respect of its high capacity, but because of its fine structure some difficulties are encountered in use. A preparation of silver granules recommended here has not only a high capacity, but also is in a convenient form for use. Silver granules were first prepared by *Imaeda*[4] as a reagent for oxygen determination.

Preparation of Silver Granules from Silver Nitrate

Dissolve 1.5 kg of silver nitrate in 5 l of distilled water. Pour 3.2 kg of 40% sodium hydroxide solution slowly, with stirring, into this solution. Maintain the mixture at 90–95° C for about 1 hour, and then set aside overnight at room temperature. Wash the precipitate by decantation with distilled water until it is completely free from alkali. Transfer the slurry of silver oxide to a shallow dish and dry in an oven at about 130° C. The material is converted to a suitable granular form by brushing the dried material through 14-, 24- and 42-mesh sieves. Moisten any powdery residues which pass 42-mesh again and granulate as before. Transfer the granules to a cylindrical vessel of hard glass and heat in a electric

furnace at 500–550° C until the silver oxide decomposes to silver metal. Too long heating or too high a temperature of heating must be avoided, otherwise the surface structure of the silver granules deteriorates and their absorptive capacity is lowered. After the granules have cooled, sieve again. The yield of granules of 14–24 mesh is 748 g, of 24–42 mesh is 158 g, and of fine powder is 26 g. Preparations of either 14–24 mesh or of 24–42 mesh granules are satisfactory absorbents for halogens and sulphur.

Another method[5] by which silver chloride is used as a starting material has been tried, but the absorptive capacity of the preparation has been found lower than that of granules made from silver oxide.

Relative Capacity of the Silver Granules for Bromine and Sulphur

The absorptive capacity for bromine was determined, by the same method as previously reported[1], using benzene hexabromide as a sample. The results obtained are shown in Table I.

Table I. Capacity of absorbent for bromine

	Silver granules				Electrolytic silver wool
Starting material	AgCl	$AgNO_3$	$AgNO_3$	$AgNO_3$	—
Size of the granules (mesh)	14 ~ 24	14 ~ 24	14 ~ 24	24 ~ 42	—
Apparent specific gravity of the granules*	1.1	3.4**	1.9	2.0	—
Weight of the granules filled in an absorption-funnel (g)	0.416	1.184	0.725	0.818	0.370
Total amount of bromine absorbed quantitatively (g)	0.101	0.321	0.236	0.239	0.115
Relative capacity of absorbent (g/g)	0.242	0.271	0.325	0.296	0.315

* Weight (g) of unit volume (1 cm^3) of the granules.

** This is a preparation obtained by heating silver granules at higher temperature and for longer time than recommended above.

In this series, the silver-heater and the stationary furnace were maintained at 435° C and 750–800° C respectively. The results show that the absorptive capacity of the silver granules for bromine compares favorably with that of the electrolytic silver wool.

Analogous experiments were carried out to determine the capacity for sulphur using sulfathiazol as a sample. The results obtained are shown in Table II.

Table II. Capacity of absorbent for sulphur

	Silver granules		Electrolytic silver wool	Silver gauze*
Size of the granules (mesh)	14 ~ 24	24 ~ 42	—	—
Weight of the granules filled in an absorption-funnel (g)	1.261	1.200	0.205	5.376
Total amount of SO_4 absorbed quantitatively (g)	0.221	0.216	0.039	0.020
Relative capacity of absorbent (g/g)	0.176	0.180	0.188	0.004

* A roll of silver gauze (40 mesh, 5 × 10 cm).

In the series, the silver-heater and the stationary furnace were maintained at 530° C and 750–800° C respectively.

From these it can be seen that the absorptive capacity of the silver granules for sulphur oxides compares favorably with that of electrolytic silver wool and is about 45 times as great as that of silver gauze.

Relation Between Absorptive Capacity and Heating Temperature at Which the Silver Granules are Maintained

It has been suggested that the capacity is influenced by the temperature[1]. To ascertain this, the capacities for halogens and for sulphur were tested at various temperatures. The results are given in Table III, and shown graphically in Fig. 1 and 2.

Table III. Relation between capacity and temperature at which absorbent is maintained

Temperature °C	Relative capacity						
	for chlorine		for bromine		for iodine		for sulphur
	g/g	mol/g	g/g	mol/g	g/g	mol/g	g/g
250	—	—	0.112	0.0007	0.735	0.0029	—
350	0.045	0.0006	0.309	0.0019	0.729	0.0029	—
400	0.072	0.0010	0.306	0.0019	—	—	—
430	—	—	—	—	—	—	0.085
450	0.143	0.0020	0.296	0.0019	0.702	0.0029	0.095
500	0.080	0.0011	0.316	0.0020	0.680	0.0027	0.152
530	—	—	—	—	—	—	0.190
550	0.051	0.0007	—	—	—	—	—

These results indicate that there is no variation in the capacity of the granules between 250° C and 550° C for iodine, and between 350° C and 500° C for bromine. With chlorine, however, the granules behave

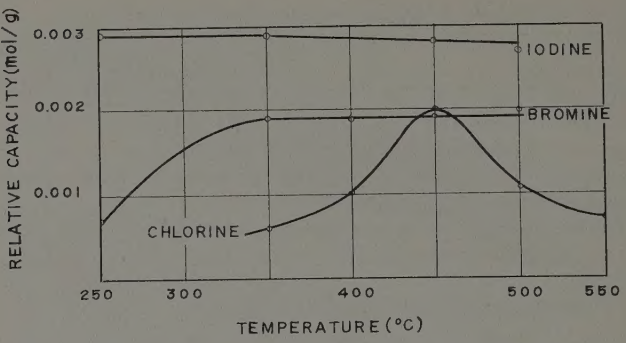


Fig. 1. Behaviour of the silver granules in the relative capacity test for halogens

differently. The capacity is markedly lowered when the granules are maintained at a temperature above the melting point of silver chloride. Consequently about 450° C is recommended as the optimum temperature for maintaining the granules.

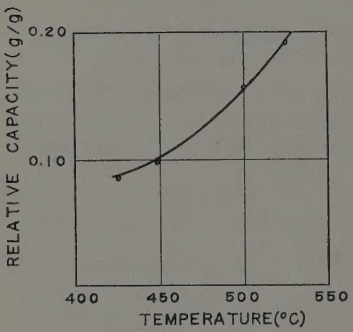


Fig. 2. Behaviour of the silver granules in the relative capacity test for sulphur

Table IV. Accuracy and precision of sulphur determinations by the method

n	$\bar{x}$ Theory (%)	σ (± %)
21	— 0.180	0.135
22	— 0.100	0.126
27	— 0.140	0.015
16	— 0.104	0.090

Sample: Sulfathiasol ($S\%$ = = 25.12), n Number of analyses, $\bar{x}$ Average of the results, σ Standard deviation of the series

The higher the temperature of the granules, the greater is their capacity for sulphur. For routine sulphur determinations they are conveniently maintained at 530° C.

Some Applications of Silver Granules to Organic Elementary Analysis

Sulphur determination: An apparatus such as that previously reported for halogens[1] can be used for sulphur determination. At least 40 successive determinations can be carried out with one absorption "funnel" if 4 mg of SO_4 normally result from each sample. Some results obtained are shown in Table IV.

Carbon-hydrogen determination: The silver granules are applicable to carbon-hydrogen determination. Halogens and oxides of sulphur can be completely removed from the combustion products by a short layer of the granules packed in the combustion tube. A modification of the usual tube filling recommended is illustrated in Fig. 3.

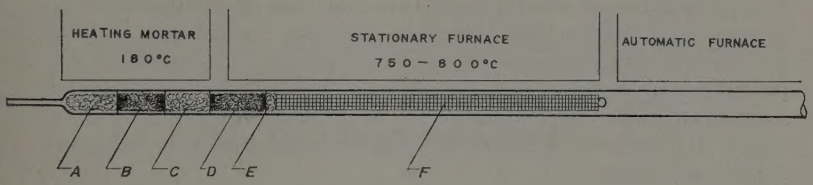


Fig. 3. Filling of carbon-hydrogen combustion tube. *A* Silica wool (30 mm), *B* Lead dioxide (27 mm), *C* Silica wool (23 mm), *D* Silver granules (30 mm), *E* Silica wool (5 mm), *F* Copper oxide gauze (180 mm)

Oxygen determination: The author has proposed a modified *Unterzaucher*'s method for determining oxygen in organic compounds[6]. In this method, iodine liberated from anhydrous iodic acid is determined by collecting it in an absorption "funnel" containing silver granules by the same procedure as in halogen determination. A diagram of the combustion train is shown in Fig. 4.

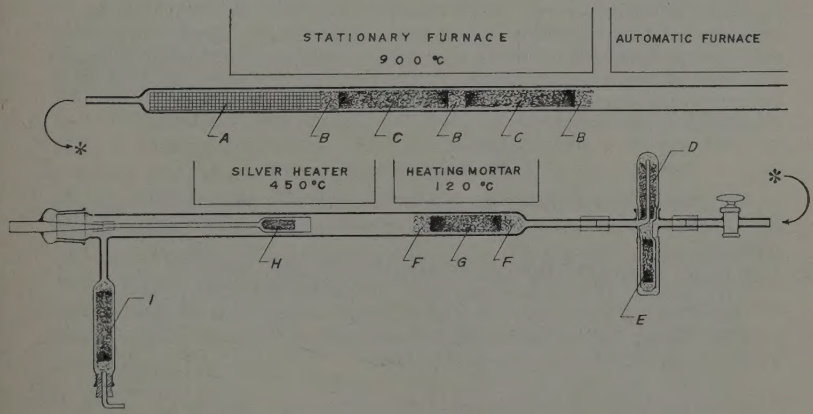


Fig. 4. Diagram of combustion train for determination of oxygen. *A* Reduced copper gauze (100 mm), *B* Platinum wool (10 mm), *C* Platinized carbon (60 mm), *D* Sodium hydroxide granules, *E* Sulphuric acid-Silica gel, *F* Silica wool, *G* Anhydro iodic acid, *H* Absorption-funnel with silver granules, *I* Soda lime

Mercury determination: The granules may be used for determining mercury in organic compounds. The method will be reported in a later paper.

Acknowledgement

Acknowledgements are due to Dr. *Hozuni* of Kyoto University for his instructive suggestions and for valuable discussion.

Summary

A preparation of silver granules has been used as an absorbent for halogens and sulphur. Its absorptive capacities for halogens and for sulphur were determined at various temperatures. The capacities are favorably compared with that of electrolytic silver wool. Having a granular form, the material is more conveniently used than electrolytic silver wool, and is applicable to the determination of carbon-hydrogen, halogens, sulphur or oxygen.

Zusammenfassung

Gekörntes Silber wurde zur Absorption von Halogenen und Schwefel verwendet. Seine Absorptionskapazität für die genannten Elemente wurde bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Sie ist gleich gut wie die elektrolytisch gewonnener Silberwolle. Die körnige Form ist aber besser zu handhaben als Silberwolle und eignet sich für die Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff, der Halogene, des Schwefels und des Sauerstoffs.

Résumé

On a utilisé une préparation de grains d'argent comme absorbant des halogènes et du soufre. On a déterminé ses capacités d'absorption pour les halogènes et pour le soufre à températures variées. Le pouvoir absorbant subit une comparaison favorable avec celui de la laine d'argent électrolytique. En raison de la forme granulaire, l'utilisation est plus facile que celle de la laine d'argent électrolytique. On peut l'appliquer au dosage du carbone, d'hydrogène, des halogènes, du soufre ou de l'oxygène.

References

[1] *T. Mitsui* and *H. Sato*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1603.

[2] *I. Robertson*, *L. M. Jett*, and *L. Dorfman*, Analyt. Chemistry **30**, 133 (1958).

[3] *W. M. Hazenberg*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 709.

[4] *K. Imaeda*, J. Pharmaceutic. Soc., Japan **78**, 386 (1958).

[5] *M. Gomberg* and *L. H. Cohne*, Ber. dtsch. chem. Ges. **39**, 3274 (1906).

[6] *T. Mitsui*, Jikkenkagaku-koza (Handbook of Chemical Experiments), Vol. XVI, p. 242. Tokyo: Maruzen. 1959.

Contribution from the Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

Avoidance of the Weighing Problem Arising from Electrostatic Charge

By

Tetsuo Mitsui and **Keikichi Yoshikawa**

(Received April 11, 1960)

It is well known that irregular readings are observed when an electrostatically charged material is weighed on a balance. Recently *Mizukami* and *Ieki*[1] have observed that an absorption "funnel" containing silver granules[2] sometimes gives an unexpected weight, and the phenomenon becomes significant when relatively large amounts of silver halides have been deposited on the granules. They have proved experimentally that the phenomenon is caused by electrostatic charge. Generally it is not observed when the relative humidity of the laboratory air is above 50%. Various methods have been recommended to dissipate the charge[3]. The method described here is simple and convenient.

A static charge can be generated by rubbing a material which has good insulating properties. With a material holding a charge, different readings are obtained according to its location in the balance. A piece of polyethylene rod (10 cm long, 0.4 cm diameter) was chosen as the test material. When it had been rubbed with a dry cloth, it was placed on the pan-hooks of the balance, and a tare was placed on the other pan. After 10 minutes a reading was taken. The rod was transferred from the pan-hooks to the pan, and after 10 minutes a further reading was taken. These procedures were repeated three times. The results obtained are given in Table I.

Table I. Readings for a polyethylene rod while holding a static charge

Location of the rod in the microbalance	1	2	3
On the pan-hooks	2.605 mg	2.945 mg	2.031 mg
On the pan	4.065	3.820	3.628

Larger readings were always obtained when the rod was placed on the pan than when it was placed on the pan-hooks. It was found that correct readings could be obtained by inserting the charged rod into a thin-walled tube of aluminium or of stainless steel, placing the tube and rod on the pan-hooks, and weighing. Results obtained by this procedure are shown in Table II, and indicate that an object carrying a static charge can be weighed satisfactorily by this method. The metal tube used was made by rolling a thin sheet (0.2 mm thick) of aluminium (or of stainless steel) on a rod with a suitable diameter. The length of the tube must be the same as that of the object to be weighed.

Table II. Readings for a combination of a charged rod of polyethylene with an aluminium tube

Location of the combination in the microbalance	1	2	3
On the pan-hooks	0.907 mg	0.908 mg	0.914 mg
On the pan	0.906	0.911	0.910

Summary

A simple method for avoiding the difficulty of weighing an object carrying an electrostatic charge has been proposed by which the correct weight can be obtained.

Zusammenfassung

Ein einfaches Verfahren wird beschrieben, mit dessen Hilfe sich die beim Wägen elektrostatisch geladener Objekte ergebenden Schwierigkeiten vermieden und korrekte Gewichtsangaben ermittelt werden können.

Résumé

Pour éviter la difficulté de peser un objet portant une charge électrostatique, on a proposé une méthode simple qui permet d'obtenir le poids correct.

References

[1] *S. Mizukami* and *T. Ieki*, Private communication.

[2] *T. Mitsui*, *O. Yamamoto*, and *K. Yoshikawa*, Mikrochim. Acta [Wien] **1961**, 521.

[3] *Al Steyermark*, Quantitative Organic Microanalysis. New York: Blakiston. 1951. p. 30.

Faculty of Pharmacy, University of Buenos Aires, Argentina

Scheme for the Systematic Identification of Barium, Strontium and Calcium in Mixtures*

By

P. Luis

(Received November 10, 1960)

A scheme of separation has been developed and tested on the milligram scale, which permits detection of 1 μg of any of the alkaline earth metals in presence of up to 250 μg of any other alkaline earth metal.

Attainment of the limiting proportion of 1 : 250 requires a flexible procedure which, depending upon available information or the outcome of an orientation test, may be adjusted to the composition of the material under investigation so that a strongly predominant major constituent may be eliminated without removing small minors from the fraction to be tested.

The preliminary test and the conversion of the sulfates to perchlorates have been described in an earlier communication[3]. The alkaline earth group is precipitated with sulfuric acid and ethanol[1,2], and the reaction mixture is heated twice on the steam bath to accelerate the precipitation of the calcium sulfate. If large amounts of alkalies are present, i. e., more than 300 μg potassium, they may partly precipitate with the alkaline earth sulfates; naturally, the precipitated amount will be missed in the alkali group, which is of no serious consequence, and the precipitated alkali sulfates do not interfere with the analysis of the alkaline earth group.

For the removal of large amounts of barium, it was found practical to precipitate most of it as nitrate from an acetone solution. The small amount of barium remaining in solution is then precipitated by chromate. The chromate separation, however, is not suitable for the removal of large quantities of barium since strontium would be coprecipitated.

* Presented before the Congreso Panamericana de Farmacía y Bioquímica, Santiago, Chile, 1960.

The detection of strontium and calcium becomes rather difficult when the limiting proportions become 1 : 100 and less. Separation by precipitation had to be abandoned as inefficient due to coprecipitation. As a promising alternative, extraction of the dry nitrates was tried with ethanol-ether[2], amyl alcohol[10], acetone[11,12], butylcellosolve[9], and some others, but the results were not satisfactory. Finally, methyl ethyl ketone was tried, which up to that time had not been recommended for this purpose. It extracted calcium nitrate fairly well and rapidly, but its action proved erratic presumably due to hydrate formation. This difficulty was overcome by adding to the solvent a small amount of a mixture of nitric acid, acetic acid, and acetic anhydride.

Following the recommendation of *Williams* and *Briscoe*[5], acetone was added when precipitating with ammonium carbonate.

Reagents

All reagents used should be of analytical grade.

Acetone, redistilled;

50% Acetone, equal volumes of acetone and water;

Aceto-nitric reagent: in a small, dry flask mix 1.5 ml acetic anhydride, 2 ml glacial acetic acid, and 1 ml 15 *M* nitric acid; do not keep longer than one week;

Ammonium carbonate reagent: saturate 4 *M* ammonia with ammonium carbonate;

Chromate reagent: dissolve 1 g potassium dichromate and 5 g ammonium acetate in water and dilute to 25 ml. If the ammonium acetate is not neutral, dissolve it first and neutralize with ammonia or acetic acid by using bromothymol blue as external indicator;

Methyl ethyl ketone, dried with magnesium sulfate and distilled;

Oxalate reagent: add 5 ml 12 *M* ammonia to 100 ml saturated solution of sodium oxalate;

Perchloric acid, 60%;

Potassium iodide, 12.5 g KI per 100 ml aqueous solution;

Sodium rhodizonate, solid salt;

Sulfuric acid-alcohol: add 1.1 ml 18 *M* sulfuric acid to 100 ml 95% ethanol.

Precipitation of the Alkaline Earth Group

Die following directions assume that about 50 μl of solution are given, which contain not much more than 500 μg of alkaline earths as may happen when 1 mg of solid sample is taken for investigation. If more than 250 μg of calcium are present, the solution must be diluted.

As a rule, one has to start with the centrifugate from the ammonium sulfide group.

Scheme of Separation

Precipitate with H_2SO_4 and ethanol; evaporate the washed sulfates with KI and $HClO_4$; extract with acetone

↓ Acetone Solution of Perchlorates: perform orientation test; only if much barium is present, treat with conc. nitric acid

↓ Residue: $KClO_4$; reserve

↓ Acetone Solution containing (Ba), Sr, and Ca: remove acetone and acid by evaporation to dryness, dissolve the residue in water and add chromate and ammonium acetate

↓ Precipitate: $Ba(NO_3)_2$

↓ Centrifugate, S. 1: precipitate with ammonium carbonate and acetone; evaporate the washed carbonates with nitric acid; extract the dry nitrate residue with methyl ethyl ketone containing some acetic anhydride, glacial acetic acid, and nitric acid

↓ Precipitate, P. 1: $BaCrO_4$

↓ Extract, E. 2: add H_2SO_4 and ethanol

↓ Residue, R. 2: $Sr(NO_3)_2$

↓ Precipitate: $CaSO_4$; recrystallize $CaSO_4 \cdot 2\,H_2O$

Treatment of the Filtrate from the Ammonium Sulfide Group. Transfer the filtrate or centrifugate to a glass spoon of 1- to 1.5-ml capacity[3]. Add 12 *M* HCl until distinctly acid. Heat by moving the spoon in a narrow circle 2 or 3 cm above a microflame. When the solution has evaporated, gradually go lower with the circling spoon and keep it in motion until the ammonium salts are completely expelled. Allow the spoon to cool and then extract the residue with two portions of 25 μl water[6]; each time try to wet the whole residue. Collect the extracts in a 0.7-ml microcone. After centrifuging, transfer the clear extract to another microcone; reject any solid that has been collected.

Precipitation of the Alkaline Earth Group. Use the clear extract obtained in the preceding paragraph or about 50 μl of any neutral solution of alkalis and alkaline earths, which does not contain more than a total of 1 mg of salts.

Add 10 μl of sulfuric acid-alcohol for every 4 μl of the solution to be treated. Mix with a glass thread while heating in a steam bath or heating block. When the mixture starts boiling, remove the cone from the heating device and allow it to stand for one minute. Then stir and heat once more to boiling.

Record appearance and amount of precipitate. If it is gelatinous, calcium is present; a dense granular precipitate indicates barium or strontium.

Centrifuge and transfer the solution which contains the alkalies to another cone. Wash the precipitate with 25 to 50 μl 75% ethanol (mixture of 3 volumes alcohol with 1 volume water) depending upon the amount of precipitate. If the precipitate is gelatinous, repeat the washing once.

Analysis of the Alkaline Earths Group

Conversion to Perchlorate. Add 50 μl water to the washed sulfates, stir to obtain a slurry, and transfer the latter to a glass spoon by means of a medicine dropper drawn out to a capillary of about 0.6-mm bore. Drive off the water by heating the spoon over a microflame or upon a heating block at about 170° C. Complete the transfer of the precipitate by adding 70 μl 60% perchloric acid to the cone, mixing, and adding the thin slurry to the residue in the spoon. Then add 25 μl of the iodide solution to the contents of the spoon and evaporate the mixture over a microflame as directed in the preceding section. The evaporation is complete when the dense vapors of perchloric acid cease. Allow the spoon to cool and then add 75 μl perchloric acid and 25 μl iodide solution for a repetition of the evaporation. This time, make certain that all perchloric acid is expelled; acid remaining with the residue would affect the rhodizonate test. Beware of overheating, however, to avoid decomposition of the perchlorates, which starts at about 450° C.

Allow the spoon to cool and then moisten the whole residue with about 70 μl acetone. The perchlorates of the alkaline earths dissolve readily. Separate the acetone extract from the insoluble potassium perchlorate by taking it up into a capillary pipet[6]. If too much acetone should have evaporated, treat the residue in the spoon with 50 μl more of acetone and take up also this extract with the capillary pipet. Reserve the residue of potassium perchlorate in the spoon.

Orientation Test. Perform the test with the solution of the perchlorates in acetone, but do not use more than 4% or one twentyfifth of this solution.

Dissolve a few tenths of a milligram of solid sodium rhodizonate in one drop of water. Cut a narrow strip, 0.2 mm wide and 15 mm long, of filterpaper, Whatman No. 1 or equivalent, and briefly touch one end of it to the clear rhodizonate solution so that the reagent occupies one

to three millimeter of the strip. Then add minute volumes of the solution of the perchlorates from the capillary pipet. Very briefly touch the impregnated end of the paper strip with the tip of the pipet and watch for the appearance of a distinctly red color. If no coloration is visible, continue adding small increments of the solution of perchlorates in acetone, but do not use more than 4% of the solution. If necessary, finally inspect the paper strip under the microscope by illumination with reflected light.

If there is no red coloration or a very faint red spot and the sulfate precipitate was gelatinous, calcium must be present, but barium and strontium are either absent or present in small quantity. Proceed as under A.

If a distinct red spot is obtained, wet the paper with oxalate reagent which has been freshly diluted with ten volumes of water[3,7]. Consider three kinds of outcome:

1. the red spot remains unchanged: barium is present and a much smaller amount of strontium may be present; proceed as under B;

2. the red spot becomes lighter, but does not disappear: barium and strontium are present, and their relative amounts may be estimated from the intensity of the spot before and after adding the oxalate reagent; proceed as under C;

3. the red spot becomes colorless or brownish yellow: strontium is present, and small amounts of barium may be present; proceed as under A.

A. Little or No Barium is Present

Transfer the solution of perchlorates in acetone to a microcone and extract the residue in the spoon with two more portions of 50 to 70 μl acetone. With the capillary pipet already used for this purpose, transfer the two extracts to the first extract in the microcone. Evaporate the combined acetone solutions by blowing filtered air into the cone, and remove the last traces of solvent by heating on the steam bath.

Precipitation of Barium Chromate. Dissolve the residue in the microcone in a volume of water adjusted to the amount of solid; as a rule, 20 μl water will do. Be certain to spread the water over the interior surface of the cone so that none of the residue escapes dissolution. Whirl the cone. Lift off the collected clear centrifugate without taking along any solid in the tip, which might be mistaken for a precipitate when testing for barium.

Test for Barium. Transfer the clear solution to a microcone that has been carefully cleaned. Add 2 μl of chromate reagent and mix. Heat one minute in the steam bath. Allow to cool for one minute and then spin in the centrifuge. Inspect the tip of the cone for a precipitate. If a precipitate is discovered, transfer the clear supernatant solution,

S. 1, to another microcone and confirm the presence of barium by treating precipitate, P. 1, with 5 μl 0.1 *M* acetic acid and 5 μl acetone. Stir, centrifuge, and again inspect the tip under the microscope; a binocular microscope and reflected light are recommended. Only a small amount of precipitate may occur, and it will be barium chromate if the recommended precautions have been properly taken.

Separation of Calcium and Strontium. Treat the yellow solution, S. 1, with 4 to 6 μl ammonium carbonate reagent and then add acetone so that the resulting mixture contains 40% to 50% of it. Mix by stirring and centrifuge after two minutes. Record the amount of carbonate precipitate. Remove and reject the centrifugate, and wash the carbonate precipitate once with 20 μl to 40 μl of 50% acetone.

Treat the washed carbonate precipitate with 15 to 20 μl 1 *M* nitric acid. Transfer the resulting solution to a 1-cm diameter glass spoon. Evaporate the solution by placing the spoon upon a heating block at 160 to 170° C. When the residue has become dry, place the spoon into a desiccator for cooling.

In the following extraction of calcium nitrate, use dry apparatus and work quickly to minimize the absorption of water vapor from the atmosphere. First, prepare a mixture of 5 μl aceto-nitric reagent with 200 μl methyl ethyl ketone. Then extract the nitrate residue in the spoon with three 50-μl portions of this mixture. Always using the same capillary pipet with rather wide tip, add the solvent mixture so that the whole residue is moistened and then, without delay, collect the liquid and transfer it to a microcone. Keep the third extract in the micropipet. Centrifuge the cone with the first two extracts and transfer the clear solutions, E. 2, to another microcone. Wash any solid remaining in tip of the cone with the third extract which has been kept in the pipet; mix, centrifuge, and discard the clear supernatant solution.

Testing for Strontium. Record the amount of residue, R. 2, from the extraction, presumably strontium nitrate, which is mostly left in the spoon and partly collected in the microcone. Treat the salt in the cone with 2 μl 60% perchloric acid and 15 to 20 μl water and transfer the resulting solution to the spoon containing most of R. 2. Evaporate the contents of the spoon over a microflame as described above so that the acid is completely eliminated without overheating and decomposing the residual perchlorate.

When the spoon has cooled to room temperature, wet the whole residue with about 20 μl acetone. Allow the acetone to evaporate until only a few microliter of solution remain. Take these into a capillary pipet and perform the rhodizonate test as described above. This time, however, use the whole solution if this should be necessary to obtain the red spot indicating strontium.

Test for Calcium. Most of the calcium should be in extract, E. 2. Add to it 5 μl of sulfuric acid-alcohol reagent, stir, and after waiting for one minute, spin in the centrifuge. Record the amount of collected precipitate.

To confirm the presence of calcium, especially when only a very small amount of precipitate has been obtained, remove the supernatant solution and treat the precipitate with 2 to 5 μl 0.05 *M* sulfuric acid. Stir, centrifuge, and transfer the solution to a clean slide. Warm until the droplet starts evaporating and then place the slide under the microscope and search for crystals of gypsum[8]. If none are found, warm the residue upon the slide with 2 μl water and again search for crystals.

Be certain to perform a blank test with the reagents if only little calcium is found.

B. Much Barium Is Present

Transfer to a microcone the acetone extract remaining after the orientation test and, as under A, two more acetone extracts of the residue in the spoon. Add about 20 μl 15 *M* nitric acid. Stir, allow to stand for one minute, and then centrifuge. Record the volume of the collected barium nitrate and transfer the clear supernatant solution to a small glass spoon. Evaporate the contents of the spoon by cautiously blowing a stream of air over it and finally drying over a microflame. After cooling to room temperature, dissolve the residue in the spoon by treating it with two portion of 7 to 8 μl water. Collect the solution in a microcone and then continue as told in A. with the precipitation of the remaining barium as barium chromate.

As a rule, not much calcium or strontium will be found, and the volumes of solvents should be reduced to 15 μl or less depending upon the amount of alkaline earths. If a considerable amount of calcium is present, however, the extraction with methyl ethyl keton should be made as complete as possible since any remaining calcium interferes with the rhodizonate test for strontium.

C. Barium and Strontium Are Present

Transfer the acetone solution of the perchlorates of the alkaline earths to a microcone and evaporate to a volume of about 40 μl. Add 35 μl water and 5 to 7 μl ammonium carbonate reagent. Stir, centrifuge, and discard the centrifugate. Wash the alkaline earth carbonates with one 50-μl portion of 50% acetone and then dissolve them in about 20 μl 1 *M* nitric acid and continue as directed under A. for the separation of strontium and calcium.

Summary

A scheme of separation has been devised and tested, which permits detecting 1 μg of any one of the common alkaline earth metals in

presence of 250 μg of the others. On the milligram scale, the precipitation and analysis of the group requires from 40 to 75 minutes.

Zusammenfassung

Ein Trennungsgang, der den Nachweis von 1 μg jedes der üblichen Erdalkalien in Gegenwart von 250 μg der anderen gestattet, wurde ausgearbeitet und geprüft. Im Milligramm-Maßstab genügen 40 bis 75 Minuten für Fällung und Analyse der Gruppe. Auf Grund einer Vorprüfung wird der Trennungsgang der Zusammensetzung der Probe angepaßt. Große Mengen von Barium werden als Nitrat in Aceton abgeschieden; Calciumnitrat wird mit Methyläthylketon extrahiert.

Résumé

On a élaboré et mis à l'épreuve un plan de séparation qui permet de déceler 1 à 2 μg de chacun des métaux alcalino-terreux connus, en présence de 250 μg des autres. A l'échelle du milligramme, la précipitation et l'analyse du groupe demande 40 à 75 minutes.

Literature

[1] *E. Zettnow*, Pogg. Ann. **130**, 324 (1867).

[2] *W. F. Hillebrand, G. E. F. Lundell, H. A. Bright,* and *J. I. Hoffman*, Applied Inorganic Analysis, 2nd ed., New York: Wiley. 1953.

[3] *P. Luis*, Mikrochim. Acta [Wien] **1959**, 536.

[4] *F. Feigl*, Mikrochem. **2**, 188 (1924).

[5] *P. E. Williams* and *H. T. Briscoe*, Chem. News **145**, 177 (1932).

[6] *H. Malissa* and *A. A. Benedetti-Pichler*, Anorganische qualitative Mikroanalyse. Vienna: Springer-Verlag. 1958. p. 11.

[7] *H. Weisz*, Mikrochim. Acta [Wien] **1959**, 29.

[8] *P. E. Wenger* and *R. Duckert*, Réactifs pour l'analyse minérale, 2me rapport. Basle: Wepf & Cie. 1945.

[9] *H. H. Barber*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 572 (1941).

[10] *P. E. Browning*, Amer. J. Science **54**, 50, 314 (1892), according to: *F. J. Welcher*, Organic Analytical Reagents. New York: Van Nostrand. 1947.

[11] *P. B. Stewart* and *K. A. Kobe*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 298 (1942).

[12] *R. N. Shreve, C. H. Watkins*, and *I. C. Browning*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 215 (1939).

Analytical Institute of the University of Vienna, Austria

On the Use of Azo Dyes for the Spectrophotometric Determination of Uranium and Thorium in Mixed Solvents

I. The Determination of Tetra- and Hexavalent Uranium by Means of Solochrome Black 6 BN

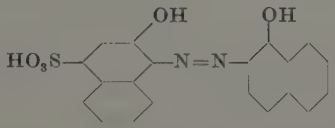
By

J. Korkisch and G. E. Janauer

(Received January 2, 1961)

The methods described in this series are the results of research work carried out in cooperation with the International Atomic Energy Agency and the United States Atomic Energy Commission. A great number of azo dyes were tested for their suitability as reagents for the photometric determination of uranium and thorium.

This paper deals exclusively with the determination of uranium by means of Solochrome Black 6 BN, 1-(2-hydroxy-1-naphthylazo)-2-naphthol-4-sulfonic acid:



In slightly acid solution containing methanol, ethylene glycol, etc., this dye gives a reddish color which, on adding tetravalent uranium, changes to blue. This fact has been used for the chelatometric titration of uranium[1], zirconium, and hafnium[2]. Furthermore in acetate buffered solutions containing organic solvents, the dye dissolves with a blue color and reacts with hexavalent uranium to give a violet-blue complex. This latter reaction, however, takes place only in solutions which contain an appreciable amount of zinc ions. It appears likely that the uranium first forms a zinc-uranyl acetate which, in turn, reacts with the dye to give a complex of a higher order.

In the following, the spectrophotometric determinations based upon the reactions of four- and sixvalent uranium shall be described.

Apparatus

A Beckman model B spectrophotometer with 1-cm cells and a blue-sensitive photocell was used. The solutions to be measured were made up in volumetric flasks of 10-ml capacity.

Reagents

Uranium(VI) Stock Solution, 10.00 mg U/ml: 21.092 g $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, reagent grade, was treated several times with excess of hydrochloric acid and evaporated upon the steam bath. The residue was dissolved in 1000.0 ml 10 *M* HCl. The uranium concentration of the resulting solution was checked gravimetrically[9].

Uranium(IV) Test Solution, 1.00 mg U(IV)/ml: 10.00 ml uranium(VI) stock solution was transferred to a 100-ml volumetric flask where it was treated with 1 g metallic zinc. During the rather vigorous reaction, the solution assumed the brown color of uranium(III). When the metal had completely dissolved, the contents of the flask were kept in a swirling motion for one to two minutes to assure complete oxidation to U(IV). Finally, distilled water was added to get 100.0 ml solution.

Since U(IV) is slowly oxidized, it proved necessary to prepare a fresh batch of this solution every day. Of course, the reduction may also be carried out by passing the U(VI) solution through reductors: Jones[10], lead[11,12], or silver[13] reductor.

Uranium(VI) Test Solution, 0.5 mg U/ml: 5.00 ml of the stock solution was diluted to 100.0 ml with 1 *M* HCl.

Solution for the U(IV) Blank Test: 1 g metallic zinc was dissolved in 10 ml 10 *M* HCl, and the solution was diluted with distilled water to 100.0 ml.

Dye Solution, 0.35%: Solochrome Black 6 BN (Imperial Chemical Industries Ltd., Hexagon House, Blackley, Manchester) was dissolved in methanol, and the solution was filtered before using it.

Sodium Acetate Solution, 2.5 *M*: 340.2 g sodium acetate trihydrate, reagent grade, was dissolved in 800 ml water. The solution was filtered and then diluted to 1 l with distilled water.

Zinc Acetate Solution, 10%: 10 g zinc acetate dihydrate, was treated with 1 ml 1 *M* HCl, where upon methanol was added to obtain a volume of 100 ml.

Solvents. All solvents used were of "chemically pure" grade.

Exploratory Investigation

As a rule, the solutions for the measurement of absorption were prepared by treating uranium test solution with the reagent in a 10-ml volumetric flask, the contents of which were then diluted to the mark and mixed. All statements concerning uranium concentrations refer to the final solutions which are ready for photometric evaluation. Likewise the amounts or volumes of reagents given refer to those contained in the 10-ml batches ready for photometry.

The absorbance maxima were determined with the spectrophotometer, and it was found that maximum absorption is obtained at 640 nm ($m\mu$) for the complexes of U(IV) and U(VI) if the solution is buffered with acetate. In dilute hydrochloric acid solution, the blue complex of U(IV) gives an absorbance maximum at 580 nm.

The complex of U(VI) forms only in presence of zinc acetate. In the instance of the U(IV) complex, it was found advisable to add at least 2 ml acetate solution since the absorbance varies with the acetate concentration if less is taken. Consequently all photometric measurements were performed on acetate buffered solutions.

In general, the absorbance of the final solution increases when increasing amounts of dye are added. Ranges could be found, however, within which the dye concentration could vary without changing the absorbance. These ranges correspond to adding 1.5 to 2 ml dye solution in the instance of U(IV) and 2 to 4 ml dye solution in the determination of U(VI).

Methanol was chosen for the organic solvent to be added, but several other solvents were tried. Ethylene glycol, glycerol, ethanol, and acetone were found approximately equivalent to methanol; isopropanol gave considerably lower absorbance. It remained to find the optimum amount of solvent. In the instance of methanol and the determination of U(IV), the absorbance of the final solution decreases somewhat if more than 2.5 ml of the solvent is added. Nevertheless it was decided to add 7 ml methanol since this permitted to find a range in which the dye concentration remained without influence upon the absorbance.

The effects of time, temperature, and order of mixing the reagents were investigated for the determination of U(IV) and of U(VI). The absorbance of the final solution remained unchanged after 24 hours, and the temperature could be raised from 15° to 30° C without causing a noticeable change in the photometer readings. The order in which the reagents were mixed did not affect the absorbance.

Systematic experiments showed that a maximum of absorbance is obtained with 1.5 ml zinc acetate solution.

The interfering ions are the same for both determinations, U(IV) and U(VI). For the study of the effect of other ions, measured volumes

of solutions with known concentrations of these ions were evaporated. In each instance, the residue was taken up with 0.5 ml 1 *M* HCl. Uranium test solution and the reagents were added as usual, and the volume was adjusted to 10 ml. For each trial, 0.5 mg uranium was taken, and 0.5 mg or 1 mg of the foreign ion was added. Determination of the absorbance showed that Mg, Ca, Sr, Ba, La(III), Pr(III), Nd(III), Zn, SO_4, F, I, and ascorbic acid do not interfere with the determination of uranium. Slight interference was observed with Pb(II) and Cd. The absorbance was strongly affected by the presence of Al, Sn(II), Bi, Cu(II), Ce(IV), Yb(III), Ti(IV), Zr, Th, V(V), Cr(III), Mo(VI), Mn(II), Fe(III), Ni(II), and Co(II). Phosphate precipitates the uranium and must be absent for this reason.

Procedures for the Determination of Uranium

Since the number of interfering ions is rather large, separations usually have to precede the spectrophotometric determination of uranium. For this purpose, ion exchange methods using strongly basic exchangers like Dowex 1 or Amberlite IRA 400 are recommended[3–8]. Dowex 1 in hydrochloric acid–alcohol is most suitable[7,8].

The solution containing the uranium is transferred to a dish of vitreous silica and evaporated to dryness on the steam bath. The residue is briefly ignited to remove organic matter. It is then treated with a few milliliters of 6 *M* HCl and again evaporated to dryness to assure complete conversion to chloride. The residue of evaporation is used for the photometric determination.

Photometry of the U(VI) Complex. The residue which should contain between 10 and 200 μg U is covered with 0.50 ml 1 *M* HCl and allowed to stand for 10 to 15 minutes. Then 0.75 ml of the zinc acetate solution, 1.50 ml of the dye solution, and 2.25 ml methanol are added. After mixing, some of the solution is transferred to the dry cell of the photometer. The absorbance at 640 nm is corrected for the absorbance observed with a reagent blank.

Beer's law is obeyed in the range up to 200 μg U. A calibration curve may be obtained by following the given procedure with controls (solutions with known amounts of uranium). In our experiments, the relative error never exceeded $\pm$ 0.05; if less than 10 μg U is present, the relative error may reach or exceed $\pm$ 0.1.

Photometry of the U(IV) Complex. Ten milliliter of 10 *M* HCl are used to dissolve the residue from the evaporation and to transfer it to a 100-ml volumetric flask. The transfer is made complete by rinsing with 5 to 10 ml distilled water. The solution in the flask is treated with 1 g metallic zinc as in the preparation of the U(IV) test solution and, at the same time, a reagent blank is prepared by dissolving 1 g zinc

in 10 ml 10 *M* HCl. Finally both solutions are diluted to the mark, 100 ml.

A 0.100- to 1.00-ml aliquot of the uranium solution, which should contain between 50 μg and 1 mg uranium, is transferred to a 10-ml volumetric flask. If the aliquot is a ml < 1 ml, $(1 - a)$ ml of the reagent blank is added. Then 2 ml each of sodium acetate solution and of dye solution are added, and the volume is brought to 10.0 ml by filling up to the mark with methanol. The absorbance at 640 nm of this solution is corrected for that of the reagent blank.

Beer's law is observed up to 100 μg U/ml. A calibration curve may be obtained by following the given procedure with controls. In our experiments, the relative error was $\pm$ 0.03 to $\pm$ 0.05 for the concentration range 5 μg U/ml to 100 μg U/ml. Photometry of more dilute solutions is likely to give relative errors of more than $\pm$ 0.1.

Acknowledgement

The work upon which this report is based was sponsored by the International Atomic Energy Agency and the United States Atomic Energy Commission under contract No. 67/US. The generous support by these agencies is gratefully acknowledged.

Summary

Solochrome Black 6 BN in an acetate buffered medium containing methanol reacts with U(IV) to give a blue complex which permits photometric determination with 5 μg U/ml to 100 μg U/ml.

In the presence of zinc acetate, uranyl ion also may be spectrophotometrically determined by means of the same dye. From 2 μg U/ml to 40 μg U/ml may be determined with a relative error of less than $\pm$ 0.05.

Zusammenfassung

Es werden zwei Methoden zur spektrophotometrischen Bestimmung von Uran mittels Solochromschwarz 6 BN beschrieben. Dieser Farbstoff bildet mit U(IV) in acetatgepuffertem, methanolhältigem Medium einen blaugefärbten Komplex, der die Bestimmung von 5 bis 100 μg U/ml erlaubt. Mit demselben Farbstoff lassen sich auch 2 bis 40 μg U/ml in Lösungen von Uranylchlorid bestimmen.

Résumé

Le noir solochrome 6 BN en milieu tampon acétique contenant du méthanol réagit avec U-IV en donnant un complexe bleu qui permet le dosage photométrique de 5 μg U/ml à 100 μg U/ml.

En présence d'acétate de zinc, on peut aussi doser l'ion uranyle par spectrophotométrie avec le même colorant. On peut doser de 2 μg U/ml à 40 μg U/ml avec une erreur relative inférieure à $\pm$ 0,05.

Literature

[1] *J. Korkisch*, Analyt. Chim. Acta. In press.
[2] *J. Korkisch*, Z. analyt. Chem. **178**, 42 (1960).
[3] *F. Hecht, J. Korkisch, R. Patzak*, and *A. Thiard*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1283.
[4] *J. Korkisch, M. R. Zaky*, and *F. Hecht*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 485.
[5] *J. Korkisch, A. Farag*, and *F. Hecht*, Z. analyt. Chem. **161**, 92 (1958).
[6] *J. Korkisch, A. Farag*, and *F. Hecht*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 415.
[7] *J. Korkisch, P. Antal*, and *F. Hecht*, Z. analyt. Chem. **172**, 401 (1960).
[8] *F. Tera* and *J. Korkisch*, Analyt. Chim. Acta. In press.
[9] *F. Hecht* and *W. Reich-Rohrwig*, Mh. Chem. **53/54**, 596 (1929).
[10] *G. E. F. Lundell* and *H. B. Knowles*, J. Amer. Chem. Soc. **47**, 2637 (1925).
[11] *C. W. Sill* and *H. E. Peterson*, U. S. Bur. Mines Rept. Invest. No. 4882 (1952); see also Analyt. Chemistry **24**, 1175 (1952).
[12] *G. W. C. Milner* and *G. A. Barnett*, Analyt. Chim. Acta **17**, 220 (1957).
[13] *N. Birnbaum* and *S. M. Edmonds*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 155 (1940).

Laboratoire personnel de l'auteur, Seraincourt (S & O)

Applications de la chélatométrie

VIII. Semi-microdosage des halogènes non fluor dans les substances organiques

Par

Claude Hennart

(Reçu le 20 janvier 1961)

Il n'existe, à notre connaissance, aucun exemple dans la littérature de l'application d'une méthode chélatométrique pour le dosage des halogènes non fluor dans les substances organiques. Nous n'avons trouvé que des exemples de dosages d'halogénures hydrosolubles minéraux tels qu'ils ont été décrits par *Flaschka* et *Huditz*[1,2] puis par *Chmelar* et *Nosek*[3,4].

Flaschka et *Huditz* précipitent les halogénures d'argent qu'ils recueillent et, après lavage, dissolvent dans l'ammoniaque; la solution obtenue est alors traitée par un excès de tétracyanonickelate de potassium $[Ni(CN)_4]K_2$; l'argent prend la place d'une quantité équivalente de nickel qui, libéré de son complexe cyané, est dosé par l'acide éthylène-diaminotétracétique en présence de murexide.

Chmelar et *Nosek* ont ensuite remplacé la murexide par le violet de pyrocatéchine qui avait été indiqué pour le dosage du nickel par *Malat, Suk* et *Jenikova*[5].

Il semblait bien évident que ces méthodes pouvaient être appliquées au dosage des corps organiques halogénés après une minéralisation convenable. Nous avons préféré toutefois doser l'argent en excès dans le filtrat après précipitation et filtration des halogénures, ce qui nous a évité de laver et reprendre le précipité; nous avons conservé le principe de la substitution du nickel à l'argent et l'emploi de la murexide comme indicateur.

Plusieurs voies de minéralisation étaient possibles; nous avions tout d'abord choisi la technique particulièrement simple de la combustion dans la bombe suivant *Wurzschmitt*[6,7] et nous avions supprimé l'inconvénient de l'apport d'une certaine quantité de nickel dans les produits

de minéralisation en remplaçant l'appareil initial en nickel décrit par cet auteur par un modèle en platine dont nous avions, d'autre part, fixé la capacité à 2 ml. Une modification apportée par *Corner*[12], et confirmée par *Soep* et *Demoen*[14], à la technique de combustion dans une fiole d'oxygène de *Schöniger*[8–14] nous a permis, par la suite, d'appliquer cette dernière technique aux diverses substances halogénées en notre possession qui, pour la plupart, étant trop volatiles, n'auraient pu être évaluées par la méthode initiale de cet auteur. Nous avons utilisé la fiole classique décrite par *Schöniger* comportant un bouchon rodé muni d'un fil de platine terminé par un panier porte-échantillon; nous signalerons toutefois la possibilité d'utiliser un matériel analogue avec mise à feu électrique tel que l'ont décrit *Martin* et *Devereaux*[17,18].

I. Minéralisation d'après Wurzschmitt

Réactifs utilisés

Peroxyde de sodium;
Mono-éthylène-glycol;
Acide nitrique 36° Bé;
Nitrate d'argent $M/25$;
Bisulfite de sodium 36° Bé (b).

Mode opératoire

Dans une microbombe de 2 ml en platine, on introduit dans l'ordre 40 mg de mono-éthylène-glycol (soit 2 gouttes), un poids p_1 de substance (a) et 2 g environ de peroxyde de sodium; on ferme la bombe et chauffe le fond avec une petite flamme jusqu'à perception du claquement habituel. On laisse refroidir puis ouvre et place le corps de la bombe dans un bécher avec 20 ml d'eau distillée après avoir rincé le couvercle plusieurs fois à l'eau distillée chaude; on porte progressivement à ébullition jusqu'à cessation de dégagement gazeux; on ajoute 1 ml de solution de bisulfite de sodium 36° Bé (b) puis on laisse refroidir et transvase dans une fiole jaugée de 100 ml en Pyrex en rinçant plusieurs fois tout le matériel. On ajoute trés doucement et avec précautions 10 ml d'acide nitrique 36° Bé puis chauffe vers 80° C et ajoute encore 10 ml de nitrate d'argent

(a) On calcule p_1 de façon à ce qu'il contienne 1/5000 atome-g d'halogène sans toutefois dépasser un poids total de substance de 40 mg. L'emploi de petites capsules de gélatine nous a paru très pratique.

(b) Nous utilisons ici le terme commercial «bisulfite de sodium»; la solution employée ne contient en réalité que du métabisulfite $S_2O_5Na_2$ comme l'a indiqué *C. Duval* dans une récente conférence à la Société de Chimie Industrielle (14 décembre 1960).

$M/25$; on refroidit à température ambiante, agite le tout et filtre après avoir complété exactement à 100 ml au moyen d'eau distillée (c).

On prélève 25 ml du filtrat sur lesquels on effectue le dosage proprement dit comme indiqué plus loin (III).

II. Minéralisation d'après Schöniger

Réactifs utilisés

Soude caustique N exempte de chlorures;
Eau oxygénée 20 vol.;
Nitrate d'argent $M/100$;
Bisulfite de sodium 36° Bé (b);
Oxygène.

Mode opératoire

On découpe une bande de 30 mm sur 24 dans un ruban cellulosique adhésif dont l'absence d'halogènes, de même que celle de pigments minéraux, a été préalablement verifiée. On place cette bande à plat, coté adhésif au dessus, et pose au centre une plus petite bande de papier filtre sans cendres ni halogènes de 25 mm sur 6. On enroule alors le tout sur lui-même de façon à obtenir un cylindre de quelques millimétres de diamétre sur une hauteur de 24 mm, la bande de papier filtre étant placée du coté intérieur de l'enroulement. Les deux extrémités étant constituées uniquement par la matière cellulosique adhésive peuvent se fermer facilement par simple pression et pliage; on ferme d'abord une seule extrémité, pése le micro-récipient ainsi formé et ajoute la substance à peser à l'intérieur (les liquides sont immédiatement pompés par le papier filtre). On ferme immédiatement la deuxième extrémité et plie le tout pour le réduire à une petite masse vaguement cubique de quelques millimétres de coté; une deuxième pesée donne par différence le poids p_2 de substance prisonnière (d). On place la petite masse dans le panier d'une fiole de *Schöniger* de 500 ml avec une petite bande de papier filtre servant à l'allumage. On met dans le fond de la fiole 5 ml de soude N, ajoute 10 ml d'eau distillée puis une dizaine de gouttes d'eau oxygénée à 20 vol.; on opére ensuite selon la technique de *Schöniger*[8,9] dans la fiole remplie d'oxygène, fermée et renversée doucement après mise à feu. Après combustion, on agite la fiole énergiquement puis enléve le bouchon en le rinçant, de même que son panier, avec un peu d'eau distillée. On

(c) Il est bien entendu indispensable que la totalité du précipité d'halogénure d'argent soit agglomérée avant filtration; la température indiquée de 80° C facilite cette opération; la coagulation par l'éther décrite par *L. Roger*[16] rend souvent des services en cas de difficulté particulière nous avons néanmoins subit quelques échecs avec les substances iodées.

(d) On calcule p_2 de façon à ce qu'il contienne 1/20000 atome-g d'halogène sans toutefois dépasser un poids total de substance de 10 mg.

transfère la totalité du liquide dans une fiole jaugée de 100 ml en Pyrex en rinçant plusieurs fois la fiole de combustion; on porte à ébullition jusqu'à cessation du dégagement gazeux, laisse refroidir et ajoute 5 gouttes d'une solution de bisulfite de sodium 36° Bé (b) puis 5 ml d'acide nitrique 36° Bé; on chauffe vers 80° C et ajoute 10 ml de nitrate d'argent $M/100$; on refroidit enfin à température ambiante, agite et filtre après avoir complété à 100 ml au moyen d'eau distillée (c).

On prélève 50 ml du filtrat sur lesquels on effectue le dosage proprement dit comme indiqué ci-après (III).

III. Dosage proprement dit

Réactifs utilisés

Tétracyanonickelate de potassium $M/40$: on dissout 6,25 g d'acétate de nickel $(CH_3COO)_2Ni.\ 4\,H_2O$ dans 300 ml d'eau distillée puis ajoute 100 ml d'ammoniaque et 0,01 g de murexide; à cette solution on ajoute, jusqu'à virage précis au violet, une solution contenant 6,2 g de cyanure de potassium dans 500 ml d'eau distillée (on procéde d'abord par approximation sur les 9/10e de la solution nickelique et termine à la burette après avoir ajouté le dernier dixième de cette solution); on compléte la solution obtenue à 1000 ml au moyen d'eau distillée.

Chélate $M/250$: nous avons appelé ainsi une solution préparée par dissolution de 1,5 g d'éthylène-diaminotétracétate disodique dans un litre d'eau distillée fraichement bouillie; on détermine la normalité de cette solution à partir d'un poids connu de magnésium ou de zinc métalliques chimiquement purs en utilisant le noir-ériochrome T comme indicateur ou à partir d'une solution titrée de nitrate d'argent en présence du réactif ci-dessus et de murexide. Murexide 1%: on pése 0,1 g de murexide, ajoute 10 g de chlorure d'ammonium bien sec et broye le tout intimement.

Mode opératoire

A la prise d'essai, légèrement tiédie, provenant de l'une des minéralisations précédemment décrites, on ajoute 10 ml de tétracyanonickelate $M/40$, 10 ml d'ammoniaque et quelques décigrammes de murexide 1%; on coule le chélate $M/250$ au moyen d'une burette de 10 ml jusqu'au virage au violet. L'indimole[15] d'halogène non fluor est donné par la formule:

$$H_A = \frac{V \cdot 100}{p}.$$

$V = (10 \cdot N_A') - (8 \cdot N_C' \cdot V')$ dans la technique de *Wurzschmitt*.
$V = (10 \cdot N_A') - (4 \cdot N_C' \cdot V')$ dans la technique de *Schöniger*.
V' = nombre de millilitres de chélate $M/250$.
N_C' = normalité de ce réactif.
N_A' = normalité de la solution de nitrate d'argent.
p = p_1 ou p_2 suivant le cas, exprimés en grammes.

Si la substance essayée ne contient qu'une seule nature d'halogène la teneur % en cet halogène est donnée par l'une des formules ci-après:

Chlore..... $H_A \cdot 0{,}03546$
Brome ..... $H_A \cdot 0{,}0799$
Iode ..... $H_A \cdot 0{,}1269$

IV. Résultats obtenus

Nous avons expérimenté la technique décrite ci-dessus sur un certain nombre de produits halogénés; nous résumons ci-dessous les résultats obtenus sur quelques-uns d'entre eux. Le mode de minéralisation utilisé a été noté en regard des poids mis en œuvre; les essais que nous avons tentés sur quelques produits azotés ont donné des résultats assez souvent divergents que nous n'avons pas répétés ici; nous avons éprouvé fréquemment des difficultés avec les composés iodés dont les titres trouvés se sont généralement révélés plus faibles que les chiffres calculés, ceci en raison de la difficulté d'agglomérer complétement les précipités d'iodure d'argent.

Tableau I

Produit essayé	Poids en mg	Indimole calculé	Indimole trouvé
Chlorure de cinnamoyle	8,23 (B)	600	602
	8,09 (B)	—	597
Chlorure de lauroyle	9,83 (B)	457	460
	9,97 (B)	—	458
p-Chloracétophénone	30,42 (A)	647	645
	31,13 (A)	—	647
	8,07 (B)	—	644
	7,93 (B)	—	642
Chloracétate d'éthyle	25,38 (A)	816	813
	24,82 (A)	—	811
p-Toluène-sulfochlorure	9,87 (B)	525	523
	9,78 (B)	—	522
Dichloro-2,4-α-naphtol	22,67 (A)	936	940
	21,91 (A)	—	938
	5,54 (B)	—	934
	5,77 (B)	—	931
Dichloro-1,3-propanone	12,68 (A)	1568	1562
	12,51 (A)	—	1559
	3,65 (B)	—	1556
	3,41 (B)	—	1561
bis(Chlorométhyl)malonate d'éthyle	24,83 (A)	778	774
	25,16 (A)	—	781
	6,32 (B)	—	778
	6,47 (B)	—	781

(Continuation du tableau I)

Produit essayé	Poids en mg	Indimole calculé	Indimole trouvé
Acide bromacétique	28,23 (A)	718	715
	27,82 (A)	—	714
	7,08 (B)	—	716
	7,24 (B)	—	714
Acide α-bromobutyrique	33,71 (A)	599	597
	32,96 (A)	—	598
	8,60 (B)	—	595
	8,43 (B)	—	597
p-Bromotoluène	34,53 (A)	585	586
	34,89 (A)	—	585
	8,93 (B)	—	584
	9,08 (B)	—	583
1-Bromohexadécane	38,81 (A)	327	324
	39,23 (A)	—	325
	9,81 (B)	—	324
	9,96 (B)	—	324
Bromure de β-phénéthyle	36,15 (A)	540	537
	36,03 (A)	—	539
	9,02 (B)	—	536
	9,17 (B)	—	538
Tribromo-1,2,3-propane	19,82 (A)	1068	1061
	20,13 (A)	—	1059
	5,04 (B)	—	1063
	5,13 (B)	—	1061
Chlorure d'α-bromobutyryle	17,97 (A)	1078	1083
	18,78 (A)	—	1081
Dibromo-1,2 chloro-3-propane	16,26 (A)	1269	1264
	16,02 (A)	—	1266
p-Bromo-chlorobenzène	19,07 (A)	1100	1101
	18,86 (A)	—	1098
	5,01 (B)	—	1095
	4,96 (B)	—	1097
Iodo-1-butane	36,72 (A)	543	530
	36,51 (A)	—	533
	9,23 (B)	—	531
	9,12 (B)	—	529
Acide *p*-iodobenzoïque	39,02 (A)	403	394
	38,76 (A)	—	393
	9,22 (B)	—	395
	9,44 (B)	—	393

(A) Minéralisation selon *Wurzschmitt*[6,7].

(B) Minéralisation selon *Schöniger*[8,9] modifiée suivant *Corner*[12].

Résumé

Les halogènes non fluor peuvent être dosés dans les substances organiques après minéralisation par le peroxyde de sodium dans une microbombe de platine selon une technique adaptée de *Wurzschmitt* ou par combustion dans l'oxygène suivant une technique de *Schöniger* modifiée par *Corner*. Les halogènes sont ensuite précipités par une solution de nitrate d'argent de titre connu dont on mesure l'excès dans le filtrat par chélatométrie.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Halogene Chlor, Brom und Jod wird die organische Substanz entweder nach *Wurzschmitt* mit Natriumperoxyd in einer Mikrobombe aus Platin oder durch Verbrennung im Sauerstoff nach der von *Corner* modifizierten Methode von *Schöniger* mineralisiert. Die Halogene werden dann mit Silbernitratlösung bekannter Normalität gefällt, deren Überschuß im Filtrat chelatometrisch bestimmt wird.

Summary

The halogens, except fluorine, may be determined in organic materials after they have been put into inorganic form by means of sodium peroxide in a platinum micro-bomb by a procedure adapted from *Wurzschmitt*, or by combustion in oxygen by a method devised by *Schöniger* and modified by *Corner*. The halogens are then precipitated by adding standard silver nitrate solution, whose excess is determined in the filtrate by chelatometry.

Bibliographie

[1] *H. Flaschka* et *F. Huditz*, Z. analyt. Chem. **137**, 104 (1952).
[2] *H. Flaschka*, Mikrochem. **40**, 21 (1953).
[3] *V. Chmelař*, Chem. Listy **50**, 1326 (1956).
[4] *V. Chmelař* et *J. Nosek*, Prakt. Probl. Lekar. Chem. Pilsen: 1955. p. 133.
[5] *M. Malát*, *V. Suk* et *A. Jeníčková*, Chem. Listy **48** (5), 663 (1954); Coll. Czechoslov. Chemic. Commun. **19**, 1156 (1954).
[6] *B. Wurzschmitt*, Chem.-Ztg. **74**, 356 (1950).
[7] *B. Wurzschmitt* et *W. Zimmermann*, Fortschr. chem. Forsch. **1**, 485 (1950).
[8] *W. Schöniger*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 123.
[9] *W. Schöniger*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 869.
[10] *K. Präger* et *H. Fürst*, Chem. Techn. **10**, 537 (1958).
[11] *L. Erdey*, *L. Mázor* et *T. Meisel*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 140.
[12] *M. Corner*, Analyst **84**, 41 (1959).
[13] *W. J. Kirsten*, Proceedings of the International Symposium on Microchemistry held at Birmingham University August 20th to 27th 1958. Oxford: Pergamon Press. 1960. p. 132.
[14] *H. Soep* et *P. Demoen*, Microchem. J. **1960**, 77.
[15] *C. Hennart* et *E. Merlin*, Chim. analytique **42**, 490 (1960).
[16] *L. Roger*, Ind. aliment. agric. **74**, 445 (1957).
[17] *A. J. Martin* et *H. Deveraux*, Analyt. Chemistry **31**, 1932 (1959).
[18] Fischer Scientific Co., The Laboratory **28**, 152 (1960).

Aus dem Institut für Verfahrenstechnik und Technologie der Brennstoffe der Technischen Hochschule Wien

Über den Nachweis und die Ausbreitung unwägbarer Aerosolteilchen

Von

Kurt Peters

(Eingegangen am 27. Januar 1961)

Feindisperse Feststoffe können Aerosole bilden, deren Vorhandensein sich bei genügender Konzentration unter Umständen über sehr weite Strecken nachweisen läßt. Dies ist z. B. von der Ausbreitung gewisser Stäube, die mit Industrieabgasen oder durch Atombombenexplosionen in die Atmosphäre gelangen, bekannt. Der Nachweis *einzelner* Aerosolteilchen war bisher auf Substanzen beschränkt, die wie z. B. gewisse Natrium-, Lithium-, Strontiumsalze, auf Grund einer typischen Flammenfärbung im Bunsenbrenner oder infolge ihrer Radioaktivität erkannt werden können, wie Aerosole, die bei Kernreaktionen oder beim Arbeiten mit radioaktiven Substanzen entstehen können. Die Nachweisgrenze für Aerosole ist im übrigen durch die praktische Empfindlichkeit mikroanalytischer Nachweismethoden[1] gegeben; im allgemeinen ist man genötigt, aus größeren Luft- oder Gasmengen die Aerosolteilchen abzuscheiden, um Mengen von der Größenordnung von mindestens 10^{-7} bis 10^{-8} g zu erhalten, die einen mikrochemischen Nachweis ermöglichen.

Ein neuer einfacher und spezifischer Nachweis von Aerosolteilchen sehr kleiner Dimensionen wird dann möglich, wenn man Aerosole von Salzen erzeugt, die zur Bildung übersättigter Lösungen neigen. Schon Kristallkeime, deren Dimensionen weit unter den Grenzen der Sichtbarkeit und Wägbarkeit liegen, können in solchen übersättigten Lösungen eine Kristallisation auslösen. Natriumthiosulfat oder Natriumacetat sind zur Herstellung übersättigter Lösungen besonders geeignet, wie seit langem bekannt ist. Diese Salze wurden deshalb für die im folgenden beschriebenen Versuche als Modellsubstanzen verwendet.

Lösungen von Natriumacetat oder Natriumthiosulfat, die bis zu 100% und mehr übersättigt sind, lassen sich auf einfachste Weise durch längeres

Erwärmen der Salze mit entsprechenden Mengen Wasser auf dem Wasserbad herstellen. Solche übersättigte Lösungen sind außerordentlich stabil, monatelang haltbar und kristallisieren auch dann nicht, wenn man sie heftigen und andauernden Erschütterungen aussetzt. Auch durch Reiben eines Glasstabes an der Gefäßwand oder durch Staub oder sonstige Verunreinigungen wird in solchen Lösungen keine Kristallisation ausgelöst, wie häufig angegeben wird. Voraussetzung für diese Stabilität ist allerdings, daß die Lösungen genügend keimfrei gemacht werden. Eine solche „Sterilisierung" erfordert vor allem genügend langes Erwärmen unter „keimfreien Bedingungen". Nur Kristallkeime von Natriumthiosulfat bzw. Natriumacetat können solche übersättigten Lösungen zur Kristallisation bringen. Spontane Keimbildung führt bei übersättigten Natriumthiosulfatlösungen, wie zahlreiche unserer Versuche gezeigt haben, in der Regel nicht zur Kristallisation des Salzes mit fünf Molekülen Kristallwasser, sondern des Salzes $Na_2S_2O_3 \cdot 2\,H_2O$.

Die Erzeugung von Natriumthiosulfat- oder Natriumacetat-Aerosolen geschieht auf einfachste Weise durch Umschütten der kristallisierten trockenen Salze aus einem Gefäß in ein anderes.

Stellt man in Räumen beliebiger Gestalt und Größe, z. B. in Vortragssälen mit vielen hundert Kubikmeter Rauminhalt, Gefäße mit übersättigten Lösungen von Natriumthiosulfat bzw. Natriumacetat auf und erzeugt dann in der angegebenen Weise ein völlig unsichtbares und unwägbares Aerosol, so kann man beobachten, daß nach einiger Zeit und in gesetzmäßiger Weise zuerst die näher stehenden und dann die weiter entfernt oder höher oben stehenden übersättigten Lösungen zu kristallisieren beginnen. Das Eintreffen jedes einzelnen Aerosolteilchens wird sichtbar, kurz nachdem es die Oberfläche der übersättigten Lösung berührt. Es wirkt als Kristallkeim. Da die Kristalle ziemlich schnell wachsen, ist die Zeit vom Kontakt des unsichtbaren Keimes mit der Oberfläche der Lösung bis zur Bildung sichtbarer Kristalle nur kurz und kann daher für die Auswertung der Experimente praktisch vernachlässigt werden.

Dieser Nachweis der Aerosolteilchen ist absolut spezifisch, das heißt bei Erzeugung von Natriumthiosulfatkeimen kristallisieren nur übersättigte Natriumthiosulfatlösungen. Übersättigte Lösungen anderer Salze, z. B. von Natriumacetat, kristallisieren erst, wenn auch durch Umgießen von festem Natriumacetat aus einem Gefäß in ein anderes Natriumacetatkeime als Aerosol in die Luft gelangen und einzelne dieser Teilchen nach einiger Zeit die Oberfläche der übersättigten Natriumacetatlösungen berühren.

Die Aerosolteilchen bewegen sich in der Atmosphäre mit gut meßbarer Geschwindigkeit. Bei der Ausbreitung in einem langgestreckten Raum von etwa 10 bis 20 m^2 Querschnitt sind die Aerosolteilchen in 5 bis 10 m

Entfernung schon nach wenigen Minuten, in etwa 30 m Entfernung erst nach 20 bis 30 Minuten einwandfrei nachweisbar. Wie weit die Konvektion der Luft im Raum an der Ausbreitung solcher Aerosolteilchen beteiligt ist, läßt sich nur schwer feststellen, da konvektionslose Räume dieser Größe experimentell kaum zu verifizieren sind.

Für die Feststellung der Größe der Aerosolteilchen sind verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen worden.

Die Zahl der Aerosolteilchen, die beim Umschütten von körnigem Natriumthiosulfat in den Raum gelangen, kann mit ziemlicher Genauigkeit abgeschätzt werden, wenn eine genügend große Anzahl, z. B. 50 Gefäße, mit übersättigten Natriumthiosulfatlösungen im Raum verteilt aufgestellt sind, und wenn man die Wirkung der unsichtbaren Kristallkeime auf den Beginn der Kristallisation in allen Proben beobachtet und statistisch auswertet. Da sich auch der Gewichtsverlust ziemlich genau feststellen läßt, der entsteht, wenn man ein Salz aus einem Gefäß in ein anderes umschüttet, lassen sich auch Schlüsse auf die Größe der Einzelteilchen ziehen. Beim vorsichtigen Umschütten von einigen hundert Gramm Kristallen aus einem Gefäß in ein anderes konnte festgestellt werden, daß maximal 1 mg Substanz als Aerosol verloren geht, und daß daraus mindestens einige Milliarden Aerosolteilchen entstehen. Als obere Grenze für das Gewicht ergäbe sich danach 10^{-12} g für das Einzelteilchen.

Um die Sedimentationsgeschwindigkeit solcher Teilchen festzustellen, wurde versucht, möglichst „konvektionslose Räume" herzustellen, indem senkrecht stehende, unten geschlossene Glasrohre von einigen Zentimetern Durchmesser und einer Länge von mehr als einem Meter verwendet wurden, die einige Zentimeter hoch mit übersättigten Lösungen von Natriumthiosulfat beschickt wurden. Aus der Zeitdifferenz zwischen dem Kristallisationsbeginn von Lösungen in niedrigen Gefäßen und dem Kristallisationsbeginn in solchen langen, senkrecht stehenden Rohren konnten aus der Sedimentationsgeschwindigkeit gewisse Schlüsse auf die Teilchengröße gezogen werden.

Als weiteres Kriterium wurde die Wirkung der unsichtbaren Keime auf Lösungen mit verschiedenen Übersättigungsgraden, z. B. 10, 20, 50, 70 und 100%, verwendet. So konnte festgestellt werden, daß alle hochübersättigten, nicht aber beispielsweise die nur 5 oder 10% übersättigten Lösungen auskristallisieren, obwohl aus der Statistik der örtlichen Verteilung der Kristallkeime mit Sicherheit anzunehmen ist, daß Aerosolteilchen in diese Lösungen hineingefallen waren. Diese Teilchen müssen sich also in den schwach übersättigten Lösungen aufgelöst haben. Dieser Schluß erscheint berechtigt, wenn stärker übersättigte Lösungen in sehr zahlreichen Gefäßen, die in unmittelbarer Nähe standen, kristallisierten. Aus der Thomsonschen Beziehung über den Dampfdruck kleiner Tröpfchen[2]

bzw. den erhöhten Lösungsdruck sehr kleiner Teilchen[3] kann man die Teilchengröße ebenfalls annähernd berechnen.

Die Thomsonsche Beziehung gibt auch die Abhängigkeit der Löslichkeit kleiner Partikel von ihrem Radius wieder; daher kann man aus dem Übersättigungsgrad der nicht zur Kristallisation gebrachten Lösungen auf die untere Grenze der Größe der wirksamen Keime schließen. Die Sedimentationsgeschwindigkeit und die Nichtauslösung einer Kristallisation in weniger stark übersättigten Lösungen lassen mit Sicherheit den Schluß zu, daß diese Aerosolteilchen im Durchschnitt ein Gewicht von etwa 10^{-15} g aufweisen dürften, daß sie aber teilweise auch 10^{-18} g und noch weniger wiegen.

Da der Nachweis dieser Teilchen absolut exakt und spezifisch ist, die Nachweisgrenze bei üblichen mikroanalytischen Reaktionen aber mit nur 10^{-7} bis 10^{-8}, in Ausnahmefällen mit 10^{-9} g begrenzt ist, handelt es sich hier um eine Mikroreaktion, deren Empfindlichkeit die aller bisher bekannten Reaktionen um einige Zehnerpotenzen übertrifft.

Selbst eine höchstempfindliche Methode zum spektralanalytischen Nachweis kleinster Heliummengen[1] ist mit einer Nachweisgrenze von etwa 10^{-10} cm³ Gas oder 10^{-14} g Substanz gegenüber dem beschriebenen Nachweis unsichtbarer Kristallkeime noch relativ unempfindlich.

Untersuchungen über die Ausbreitung unsichtbarer Kristallkeime und ihren Nachweis werden am hiesigen Institut seit 1956 ausgeführt, vor allem in langgestreckten Laboratorien und in den Gängen und Korridoren des Instituts. Als Vortragsexperiment wurde dieser Nachweis unwägbarer Aerosolteilchen erstmalig am 24. Juni 1958 im großen Hörsaal des Physikalischen Institutes der Universität Wien im Rahmen eines Vortrages über „Grenzflächenphänomene" gezeigt.

Zusammenfassung

Beim Umschütten von körnigem oder pulverigem Natriumthiosulfat oder Natriumacetat entstehen unsichtbare und unwägbare Aerosole dieser Salze, deren Einzelteilchen etwa 10^{-15} bis 10^{-18} g wiegen und leicht dadurch nachgewiesen werden können, daß sie in übersättigten Lösungen dieser Salze, die in einiger Entfernung von der Erzeugungsstelle der Aerosole aufgestellt sind, als Kristallkeime wirken und die Kristallisation auslösen.

Summary

If granular or powdered sodium thiosulfate or sodium acetate are poured, invisible and imponderable aerosols of these salts are formed with particles which weigh around 10^{-15} to 10^{-18} g, and which can be readily detected in that they function as crystal nuclei to break down supersaturated solutions of these salts, which are set up at some distance from the place where these aerosols are produced.

Résumé

Si l'on transvase du thiosulfate de sodium ou de l'acétate de sodium, en poudre ou en grains, on produit des aérosols de ces sels, invisibles et impondérables, dont les particules individuelles, pesant 10^{-15} à 10^{-18} g environ, peuvent être décelées facilement du fait qu'elles facilitent la cristallisation des solutions saturées de ces sels, disposées à une certaine distance du lieu de production de ces aérosols, en agissant comme germes de cristallisation.

Literatur

[1] *F. Paneth* und *K. Peters*, Z. physik. Chem. **134**, 353 (1928).
[2] *W. Thomson*, Philos. Mag. J. Science [4] **42**, 448 (1871).
[3] *W. Ostwald* (1900), zitiert in *A. Eucken*, Physikalische Chemie, 2. Aufl., S. 198.

Aus der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Silikoselaboratorium, Göttingen

Die Trennung und Analyse von Aminosäuren im Ultramikromaßstab

Von

Hermann Stegemann und **Gertrud Bernhard**

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Februar 1961)

Für die quantitative Analyse von Aminosäuren aus etwa 100 μg Proteinhydrolysat reicht die Empfindlichkeit der Austauscherchromatographie nach *Stein* und *Moore* an Säulen mit 9 mm Durchmesser[1] und der darauf beruhenden neueren halb- und vollautomatischen Verfahren nicht aus. Wir beschreiben daher im folgenden etwas ausführlicher eine schon kurz skizzierte[2] Arbeitsweise an einer Säule von 3 mm Durchmesser und 175 cm Länge.

Nach Vorversuchen mit Polyäthylen- und Teflonschläuchen, in die der Ionenaustauscher eingefüllt wurde, verwendeten wir schließlich Glaskapillarrohr mit übergeschobenem Glasmantel. In den Kunststoffschläuchen waren Luftblasen, die die Tropfgeschwindigkeit einer Säule erheblich verringern, schwer zu erkennen und zu entfernen.

Die Durchführung der Mikromethode erfolgt in Anlehnung an unsere Untersuchungen über die Gesetzmäßigkeiten der Aminosäuretrennung an Austauschersäulen[3] und erfordert keinerlei Umstellung gegenüber der früher beschriebenen, mit etwa 2 mg Proteinhydrolysat optimal arbeitenden Methodik, da die gleichen apparativen Hilfsmittel und die gleichen Reagenslösungen verwendet werden.

Das ist besonders dann angenehm, wenn man von einem weitgehend unbekannten Protein nur sehr wenig zur Bestimmung des Aminosäurespektrums verbrauchen möchte und dann mit der daraus berechenbaren optimalen Menge eine größere und hinsichtlich der Genauigkeit günstigere Säule von 9 mm Durchmesser einsetzt; oder wenn man an dieser ein Hydrolysat in „präparativem Maßstab" (bis zu 1000 mg Substanz) vorgetrennt hat und aliquote Teile von unbekannten „peaks" in einem zweiten Lauf an der Mikrosäule auf Einheitlichkeit prüfen möchte. Die

Bestimmung liegt für 5 bis 10 μg je Aminosäure am günstigsten, obwohl man selbst bei 20facher Überladung einer Säule (mit etwa 2 mg Hydrolysat) noch eine ausreichende Trennung erhält.

Tabelle 1

	1	2				3	
						gefundene μg Amino-N	
	Leucin-faktor	Amberlit IR 120		Dowex 50 × 8		3-mm-Säule	9-mm-Säule
Na-acetat, Molarität		2,5		2,5			
Citratpuffer p_H		3,2	6,0	3,2	6,0		
Temperatur °C.....		50	25	50	25		
Säulenlänge cm		175	50	175	50		
Austauscher ml		15,0	4,0	10,0	2,8		
Cysteinsäure	1,00	20		17			
Met-Sulfoxyd	1,00			50			
Asp	1,05	53		56		2,0	18,2
Pro(OH)	12,60			60			
Thr.....	1,00	63		67		0,7	6,5
Ser	1,05	66		72		1,7	16,7
Glu.....	1,00	78		85		1,4	13,8
Pro	4,00	88		92		0,5	5,6
Cystin	0,61			98			
Gly.....	1,05	100		105		1,0	9,3
Ala	1,05	106		110		6,5	6,0
Val	1,05	127		128		0,4	4,0
iLeu	1,00	168		158		0,4	3,7
Leu	1,00	178		166		0,6	6,7
Tyr.....	1,00			191	22	0,3	3,0
Phe	1,00	198	16	198	23	0,5	4,5
Glucosamin.....	1,11			188	33	6,3	65,2
Lys(OH)	0,94		28		38		
γ-NH_2-Buttersäure .	1,29		28		38		
Lys.....	0,94		48		53	1,05*	8,0
Orn	0,83				53		
Galaktosamin					63		
His	1,00		61		68		
NH_4^+	1,40		79		82	3,7	34,0
Arg.....	1,00		135		195	0,9	9,7

Kolonne 1: Multiplikator für gleiche Extinktion nach Ninhydrinreaktion (Leucinfaktor).

Kolonne 2: Elutionsvolumina, geordnet nach Fraktionen à 0,25 ml, an der 3-mm-Säule.

Kolonne 3: Vergleich der Ausbeuten an der 3-mm-Säule mit den Ergebnissen an einer 9-mm-Säule (10fache Ausgangsmenge), „Conchiolin-Hydrolysat". Fehler bis ± 7%.

* Mit unbekannter ninhydrinaktiver Substanz verunreinigt.

Die Gradientenelution wird mit einer Mischbatterie aus handelsüblichen Glasgeräten durchgeführt, die etwa $^1/_{10}$ des früher[2] angegebenen Volumens fassen. Als Standardmethode für die Mikrosäule hat sich die Elution mit einem 0,2-m Natriumcitratpuffer p_H 3,20, in den eine 2,5-m Natriumacetatlösung einfließt, bewährt, während wir für die 9-mm-Säule den gleichen Citratpuffer und 4,5-m Natriumacetatlösung bevorzugen. Auf den Zusatz von Konservierungs- oder Netzmittel wird verzichtet. Da sich die basischen Aminosäuren, insbesondere Lysin, von Ammoniak an der auf 50° temperierten, 175 cm langen Mikrosäule nicht so gut trennen wie bei der Makrosäule, werden die basischen Aminosäuren gesondert an einer 50 cm langen Mikrosäule bei 25° ohne Gradient mit einem Citratpuffer von p_H 6,0 eluiert.

Die Extinktion der Farbstofflösung nach Ninhydrinreaktion mit variierten Volumina wird in 5-cm-Küvetten gemessen, die Empfindlichkeit wird dadurch um mehr als das siebenfache gesteigert. Bei „präparativen Ansätzen" empfiehlt es sich natürlich, die Messung der mit Ninhydrin zur Reaktion gebrachten Eluatfraktionen in kalibrierten Röhrchen durchzuführen. Der Blindwert und damit die Basislinie ist nicht so konstant wie bei dem früher beschriebenen Verfahren. Diese Schwankungen werden durch die besonders scharfe Trennung der Aminosäuren an der dünnen Säule zum Teil ausgeglichen.

Die Analyse der sauren und neutralen Aminosäuren dauert ohne Anwendung von Druck 40 Stunden; dabei werden 200 Fraktionen à 0,25 ml gesammelt (50 ml Puffer). Die Elution der basischen Aminosäuren ist nach 95 Fraktionen in etwa 9 Stunden abgeschlossen. Nach 80 Fraktionen wird Arginin durch 0,2-n Natronlauge ausgetrieben. Beide Säulen werden durch Natronlauge regeneriert, mit Puffer äquilibriert und erneut gefüttert. Falls die Tropfgeschwindigkeit der Säulen unter 90 Sekunden je Tropfen sinkt, empfiehlt es sich, den Austauscher auszuschlemmen, nach unseren Erfahrungen frühestens nach 15 Versuchen. Wir füllen die Säulen stets bis unterhalb des Schliffes mit Puffer oder Natronlauge, da sich sonst in dem 3-mm-Rohr leicht Luftblasen festsetzen, die ein Nachfließen des Puffers verhindern.

Als Beispiel für die Auftrennung eines Proteinhydrolysates mit etwa 100 μg Protein an Dowex 50×8 zeigt die Abb. 1 das Aminosäurespektrum des sog. Conchiolins der Schulpe von Sepia officinalis, wobei besonders das Fehlen von Cystin zu bemerken ist. Detaillierte Befunde werden an anderer Stelle veröffentlicht. Wegen unbekannter ninhydrinaktiver Verbindungen wurde von Ausbeuteangaben abgesehen.

Zum Vergleich von Austauschern wurde eine Standardlösung von Aminosäuren auch an Amberlit IR 120 (Teilchengröße 49 $\pm$ 7 μ) getrennt und die Trennung in Abb. 2 wiedergegeben. Es zeigte sich ein fast gleiches Elutionsspektrum wie an Dowex 50×8, jedoch ist es — wie früher schon

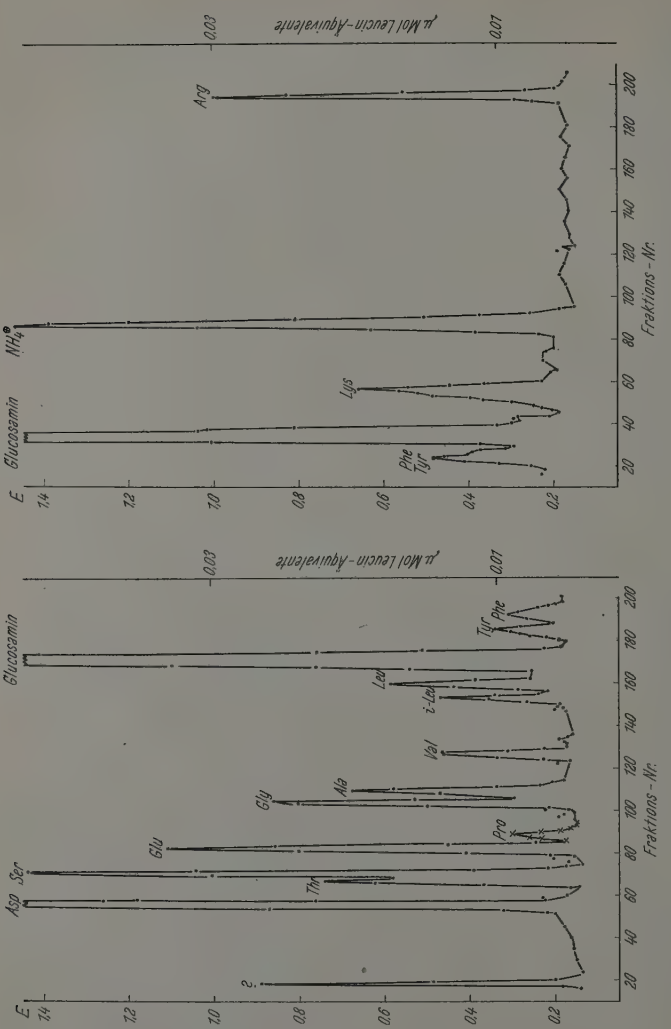


Abb. 1. Fraktionierung eines Proteinhydrolysates („Conchiolin" von Sepia officinalis) an einer Säule (1750 × 3 mm) mit Dowex 50 × 8 bei 50°. Gradientenelution: 0,2-m Citratpuffer p_H 3,2, Acetat einfließend. Für die basischen Aminosäuren: Säule 600 × 3 mm, Elution mit Citratpuffer p_H 6,0 bei 25° ohne Gradient, Arginin mit NaOH ausgewaschen

gefunden — mit Amberliten schwerer, ausreichende Strömungsgeschwindigkeiten zu erhalten. Wir erreichten eine leidliche Tropfenzahl

pro Zeiteinheit, indem wir den Amberlitaustauscher heiß mit dem Citratpuffer äquilibrierten und dann erst in die Säule füllten.

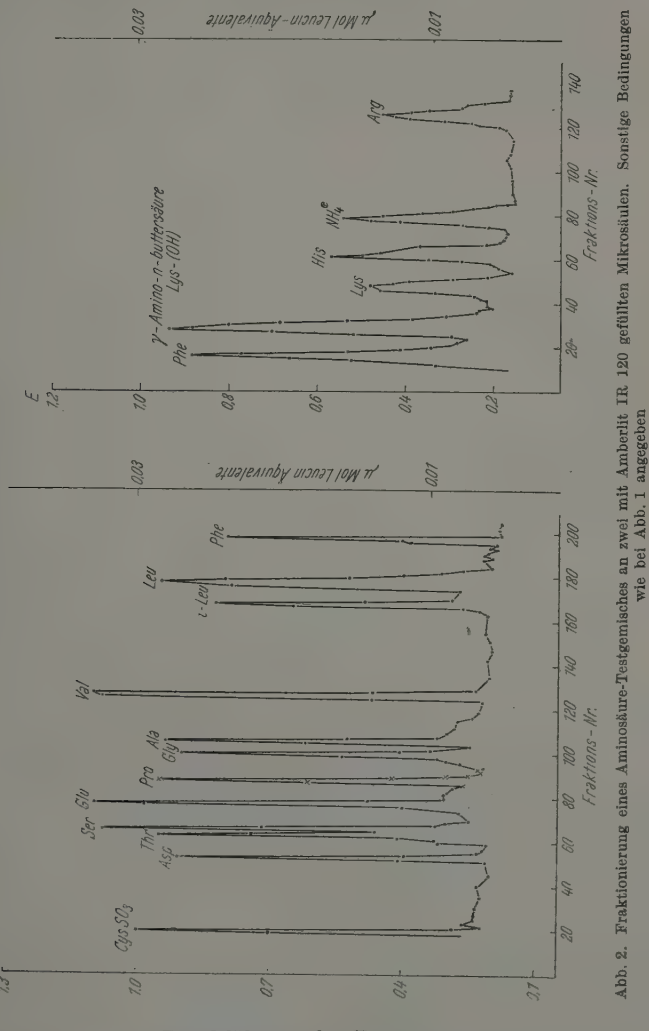


Abb. 2. Fraktionierung eines Aminosäure-Testgemisches an zwei mit Amberlit IR 120 gefüllten Mikrosäulen. Sonstige Bedingungen wie bei Abb. 1 angegeben

Durchführung der Trennung

Im wesentlichen folgen wir der früher[2] beschriebenen Technik. Die Mischbatterie für die Mikroausführung besteht aus einer handelsüblichen

100-ml- und einer 50-ml-Enghalsflasche mit NS 14,5 (Abb. 3). Die Flaschen fassen 123 ml bzw. 70 ml und sind mit Citratpuffer gefüllt. Auf die kleinere Flasche wird ein Tropftrichter mit Natriumacetatlösung aufgesetzt und der Hahn erst dann geöffnet, wenn die Rührer in Gang gesetzt wurden und die Trennung der auf die Säule gegebenen Aminosäuren beginnt. Eine Polyäthylenkapillare, die die größere Flasche mit dem Säulenkopf verbindet, trägt auf der einen Seite den doppelt durchbohrten PÄ-Stopfen (NS 14,5), auf der Säulenseite einen PÄ-Stopfen NS 7,5.

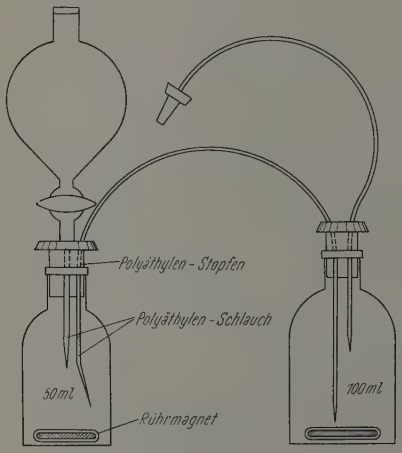


Abb. 3. Mischbatterie für Gradientenelution

Die 175 bzw. 50 cm langen Säulen bestehen aus Kapillarrohr (Innendurchmesser 3 mm) und tragen am Säulenkopf eine Hülse (NS 7,5). Ein Temperiermantel ist mit Gummischläuchen über die Säule geschoben. In das Säulenende wird ein winziger Glaswollpfropf gedrückt und dann eine passende, dicht schließende Polyäthylenkapillare von 3,5 mm Außendurchmesser (Spitze etwas ausziehen) in die Glaskapillare eingeschoben. Man füllt den in zehn Teilen 0,2-n Natronlauge suspendierten Ionenaustauscher in kleineren Schüben ein, ohne Luft einzuschließen. Bei erstmaligem Gebrauch wäscht man über Nacht oder länger bei 50° mit 0,2-n Natronlauge vor, kann dann Puffer auf die Säule geben und füttert die Analysenlösung (0,1 bis 1,0 ml), wenn die Pufferlösung das Säulenende erreicht hat. Nachdem das zu untersuchende Hydrolysat eben versickert ist, spült man zweimal mit zirka 0,2 ml Puffer nach und schließt die Mischbatterie an. Bei Ionenaustauschern mit 50 bis 70 μ Teilchengröße (Präparation vgl. [2]) oder den mittlerweile käuflichen Präparaten mit Partikeln von 45 bis 55 μ beträgt die Tropfgeschwindigkeit bei temperierter Säule 30 bis 80 Sekunden je Tropfen, so daß wir auf Druck verzichten können. Wir sammeln mit dem Gerät von Hösli, Typ FT oder TVZ, in kalibrierten, mit oberflächenaktiven Mitteln frisch gespülten Reagensgläsern Fraktionen von 9 Tropfen = 0,25 ml.

Reagenzien

0,2-m Natriumcitratpuffer p_H 3,20:

4,1 g Natriumhydroxyd pa. (99%ig) und 30,4 g Zitronensäure · 1 H_2O werden in einem 500-ml-Meßkolben mit entionisiertem Wasser gelöst, aufgefüllt und mit etwas Toluol versetzt.

0,38-m Natriumcitratpuffer p_H 6,0:

Man löst 7,8 g Natriumhydroxyd und 13,3 g Zitronensäure in einem 500-ml-Meßkolben, gibt 1,25 ml 36%ige Salzsäure dazu und füllt zur Marke auf.

2,5-m Natriumacetatlösung:

170,1 g Natriumacetat · 3 H_2O werden in einem 500-ml-Meßkolben heiß gelöst und aufgefüllt.

Durchführung der Bestimmung

Geräte

Photometer Zeiss-Elko III mit Filter S 57 und I 44;

Mikroküvetten (5,0 × 0,7 cm) und Küvettenhalter oder Reagensglashalter;

Optisch kalibrierte Reagensgläser, Reagensglasgestelle aus V 4 A-Draht hergestellt (75 Gläser fassend), dazu passende Aluminiumdeckel;

Wasserbad (ausreichend für 4 bis 6 Reagensglasgestelle);

Magnetrührer mit etwa 200 U/min, polyäthylenumhüllter Stabmagnet;

Handgetriebene Automatic-Pipette (Cornwall 1250).

Reagenzien

4-m Natriumacetatpuffer p_H 5,18 bis 5,20:

272 g Natriumacetat · 3 H_2O p. a. Merck und 124 ml 96%iger Eisessig p. a. werden in einem 500-ml-Meßkolben heiß (Wasserbad von 70°) gelöst, mit Wasser aufgefüllt, durch ein PVC-Filter filtriert und über Quecksilber aufbewahrt.

Ninhydrin-Natriumfluorid-Lösung:

Man vereinigt folgende Lösungen: 7,5 g Ninhydrin in 500 ml chemisch reinem, peroxydfreiem Äthylenglykolmonomethylester gelöst, und 1,0 g Natriumfluorid p. a. in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst.

Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) p. a., trocken aufbewahrt.

Leucinstandardlösung:

93,70 mg DL-Leucin (über P_2O_5 getrocknet), in 1000 ml 0,1-n HCl gelöst, enthält 10 μg α-NH_2—N/ml; davon wird eine 1 : 10-Verdünnung hergestellt und 10 Gläser mit je 0,25 ml eingesetzt.

Entionisiertes Wasser von einer Leitfähigkeit unter 1 μSiemens wird über dem Kationenaustauscher Lewatit S 100 (in Säckchen aus Polyestergewebe eingeschmolzen) aufbewahrt.

Partielle Reduktion des Ninhydrinreagens:

In einen trockenen 200-ml-Erlenmeyerkolben werden 225 mg $Na_2S_2O_4$ mit einer Genauigkeit von $\pm$ 1 mg eingewogen, 100 ml Ninhydrin-Natriumfluoridlösung zugegeben und 10 Minuten magnetisch gerührt. Dabei muß ein Farbspiel von Rot zu Milchigrosa (ausgefallenes, sehr fein kristallines Hydrindantin) entstehen. Man fügt 50 ml des 4-m Acetatpuffers zu, rührt weitere 5 Minuten und füllt mit der Automatic-Pipette 0,5 ml dieser Lösung unter Rühren in die Reagensgläser mit 0,25 ml Analysenlösung (ausreichend für die Analyse von 300 Proben). Diese täglich frisch hergestellte Lösung ist mehrere Stunden haltbar.

Man erhitzt 20 Minuten im sprudelnd kochenden Wasserbad (Aluminiumdeckel), pipettiert in jedes Glas 2,0 ml einer Lösung Methylglykol/Wasser 1 : 1, schüttelt gut durch, füllt jede Probe mit der Pipette in die Mikroküvette (2,75 ml) und mißt mit dem Filter S 57 (Iminosäuren mit I 44) gegen Wasser. Bei Bedarf kann mit Methylglykolgemisch verdünnt werden (je 2,75 ml).

Als Leucinstandard werden wie üblich je 0,25 ml einer Leucinlösung (mit 1 μg N/ml) mitbestimmt, die eine rechnerisch ermittelte Extinktion von 2,40 für 1 μg N aufweist.

Gegebenenfalls wird man höhere Konzentrationen nicht in Küvetten, sondern direkt in den Reagensgläsern messen.

Zusammenfassung

Die Trennung von Aminosäuren an temperierten Dowex 50 $\times$ 8-Mikrosäulen mit 3 mm Innendurchmesser wird beschrieben. Die sauren und neutralen Aminosäuren werden mittels Gradientenelution mit einem Natriumcitratpuffer p_H 3,2, in den eine 2,5-m Natriumacetatlösung einfließt, eluiert. Die basischen Aminosäuren werden an einer 50 cm langen Mikrosäule mit einem Natriumcitratpuffer p_H 6,0 getrennt. Ohne Anwendung von Druck dauert die Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren 40 Stunden, die basischen Aminosäuren werden in 9 Stunden eluiert. Die optimale Bestimmbarkeit liegt je Aminosäure bei 5 bis 10 μg, bzw. 100 μg Protein. Die aus je 0,25 ml bestehenden Eluatfraktionen werden mit durch Natriumdithionit partiell reduziertem Ninhydrin analysiert und die Blaufärbung in Mikroküvetten gemessen.

Summary

The separation of amino acids on tempered Dowex 50 $\times$ 8 micro columns with internal diameter of 3 mm is described. The acid and neutral amino acids are eluted by gradient elution by means of a sodium citrate buffer p_H 3.2, into which flows a 2.5 *M* sodium acetate solution. The basic acids are separated with a sodium citrate buffer p_H 6.0 on a 50-cm micro column. If no pressure is used, the separation of the acid and the neutral amino acids

requires 40 hours, the basic amino acids are eluted in 9 hours. The optimal determinability for the respective amino acids is 5 to 10 μg. The eluate fractions each consisting of 0.25 ml are determined by means of ninhydrin partially reduced with sodium dithionate and measured in micro cuvettes.

Résumé

On décrit la séparation d'amino-acides sur microcolonnes Dowex 50 × × 8 tempérées, de diamètre intérieur 3 mm. Les amino-acides sous forme neutre et acide subissent une élution graduelle avec un tampon p_H 3,2 au citrate de sodium, qui s'écoule dans une solution d'acétate de sodium 2,5 *M*. On sépare les amino-acides sous forme basique sur une microcolonne de 50 cm de long avec un tampon p_H 6,0 au citrate de sodium. Sans appliquer de pression, la séparation des amino-acides sous forme neutre et acide dure 40 heures; les amino-acides sous forme basique sont élués en 9 heures. Le meilleur domaine de dosage des amino-acides se situe entre 5 et 10 μg. On dose les fractions d'éluat de 0,25 ml par la ninhydrine partiellement réduite par le dithionite de sodium et l'on détermine leur volume dans des micro-fioles.

Literatur

[1] *S. Moore* und *W. H. Stein*, J. Biol. Chem. **192**, 663 (1951).
[2] *H. Stegemann*, Z. physiol. Chem. **319**, 87, 102 (1960).
[3] *H. Stegemann*, Naturwiss. **46**, 110 (1959).

Aus dem Analytischen Institut der Universität Wien

Azofarbstoffe als Reagenzien zur spektrophotometrischen Bestimmung von Mikrogrammengen Molybdän

Von

J. Korkisch

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Februar 1961)

1. Einleitung

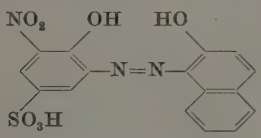
In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung von drei Azofarbstoffen, und zwar Solochrome Dark Blue B, Solochrome Black RN und Solochrome Black AS zur spektrophotometrischen Bestimmung von Mikrogrammengen Molybdän beschrieben. Diese Farbstoffe bilden mit Molybdän blaugefärbte Komplexe, die sich zur genauen quantitativen Bestimmung dieses Elements sehr gut eignen. Diese Komplexbildung erfolgt allerdings nur in salzsauer-methanolischer Lösung mit genügender Intensität, in anderen Lösungsmitteln, wie z. B. Wasser, Äthanol, Aceton usw., kommt es entweder zur Ausbildung nur sehr schwacher Komplexe oder wegen der sehr geringen Löslichkeit dieser Farbstoffe in den untersuchten Lösungsmitteln überhaupt zu keiner Reaktion des Molybdäns mit diesen Farbstoffen. Da die Bestimmung des Molybdäns sowie die des Titans mit Solochrome Dark Blue[1] in relativ stark saurer Lösung durchführbar ist, wird sie durch gegebenenfalls anwesende Fremdionen praktisch nicht gestört. Durch Eisen(III), Kupfer(II), Zirkonium und Hafnium hervorgerufene Störungen lassen sich durch Zugabe von Ascorbinsäure und ÄDTA vollständig ausschalten. Dagegen läßt sich der störende Einfluß von Vanadium, Niob, Tantal, Titan usw. durch Zusatz von Komplexbildnern und Reduktionsmitteln nicht eliminieren. Vanadium ist aber von Molybdän mittels einer früher beschriebenen Ionenaustauschmethode über die Ascorbinatkomplexe unter Anwendung des stark basischen Anionenaustauschers Amberlite IRA 400 (Ascorbinatform) trennbar[2].

Die hier beschriebenen Methoden zur spektrophotometrischen Bestimmung von Molybdän sind etwa doppelt so empfindlich wie eine früher mit dem Azofarbstoff Solochrome Violet R entwickelte Methode[3]. Es lassen sich noch 1,0 bis 2,0 μg Molybdän/10 ml Meßlösung, das ist 0,1 bis 0,2 ppm, mit ausreichender Genauigkeit bestimmen.

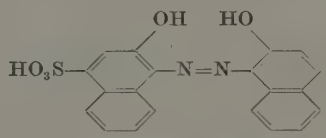
2. *Lösungen und Reagenzien*

Molybdänstandardlösungen. Eine genau gewogene Menge Ammoniummolybdat $(NH_4)_6Mo_7O_{17} \cdot 4\,H_2O$ wurde in dest. Wasser gelöst. Die entstehende Lösung wies einen auf gravimetrischem Wege überprüften Gehalt von 1 mg Molybdän/ml auf. Durch Verdünnen dieser Stammlösung mit dest. Wasser wurden Standardlösungen mit geringeren Molybdängehalten hergestellt.

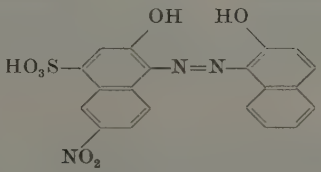
Farbstofflösungen. Es wurden 0,1%ige methanolische Lösungen der gereinigten Farbstoffe (Imperial Chemical Industries Ltd. Hexagon House, Blackley, Manchester, England) verwendet. Die Reinigung dieser Azofarbstoffe erfolgte auf dieselbe Art, die bereits für Solochrome Dark Blue B beschrieben wurde[1]. Die drei angewendeten Farbstoffe entsprechen folgenden Formeln:



Solochrome Black RN



Solochrome Dark Blue B



Solochrome Black AS

Die methanolischen Lösungen dieser Farbstoffe sind einige Wochen lang haltbar. Ferner wurden angewendet: Chemisch reines Methanol, reine Ascorbinsäure der Wiener Heilmittelwerke, 0,1-m Lösung von ÄDTA (Dinatriumsalz der Äthylendiaminotetraessigsäure) und eine Reihe von 1-n salzsauren Lösungen verschiedener Elemente.

3. *Apparatur*

Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer Modell B, unter Anwendung von 1-cm-Küvetten und einer blauempfindlichen Photozelle, durchgeführt.

4. Auswahl der geeigneten Wellenlänge

1 ml einer Molybdänlösung, die 50 μg Molybdän/ml enthielt, wurde mit 1 ml 1-n Salzsäure versetzt und nach Zugabe von 3 ml der 0,01%igen Farbstofflösung mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung gegenüber einer analog hergestellten Blindlösung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Bei Anwendung der Solochrome Black RN-Lösung erfolgten die Extinktionsmessungen im Wellenlängenbereich von 540 bis 660 nm, bei Verwendung von Solochrome Black AS und Solochrome Dark Blue B in den Bereichen von 555 bis 660 bzw. 575 bis 700 nm. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 1

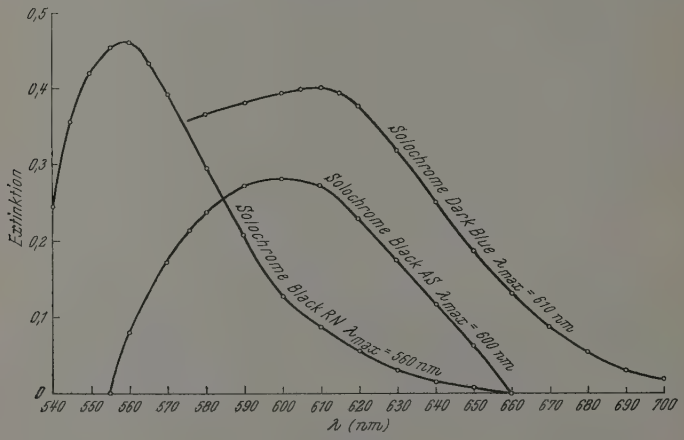


Abb. 1

zusammengestellt, aus der hervorgeht, daß bei den Wellenlängen 560 nm (Solochrome Black RN), 600 nm (Solochrome Black AS) und 610 nm (Solochrome Dark Blue B) die blaugefärbten Molybdänfarbstoffkomplexe die maximalen Extinktionen aufweisen. Alle weiteren Messungen wurden daher bei diesen Wellenlängen ausgeführt.

5. Einfluß der Farbstoffkonzentration

Es wurde eine Reihe von Lösungen hergestellt, die jeweils 25 μg Molybdän (mit Ausnahme von Solochrome Dark Blue B, wobei 50 μg Molybdän zur Messung benützt wurden) in 1 ml Wasser gelöst enthielten. Diesen Lösungen wurden verschiedene Mengen der Farbstofflösungen und je 1 ml 1-n Salzsäure zugesetzt. Nach dem Auffüllen mit Methanol auf

10 ml wurden die Extinktionen gegenüber analog hergestellten Reagensblindlösungen gemessen.

Wie aus Abb. 2 zu entnehmen ist, werden die optimalen Farbstoffkonzentrationen bei Zusatz von 2 ml (Solochrome Black AS), 2,5 ml (Solochrome Black RN) und 0,5 ml (Solochrome Dark Blue B) erreicht.

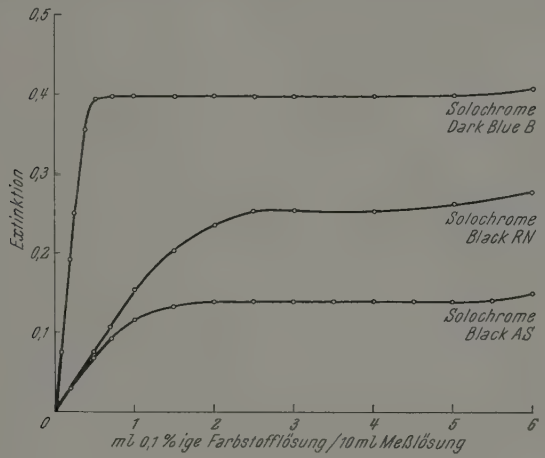


Abb. 2

Für alle weiterén Versuche wurde daher für alle drei Farbstoffe die im Konstanzbereich der Extinktion liegende Farbstoffkonzentration von 3 ml verwendet.

6. Einfluß der Acidität und der Methanolkonzentration

Eine Reihe von Versuchen zeigte, daß die Extinktion nur wenig von der Acidität abhängig ist, sofern salzsaure methanolische Lösungen verwendet werden. In neutraler bzw. alkalischer Lösung kommt es fast nicht zur Ausbildung gefärbter Molybdänkomplexe der Farbstoffe. Die günstigsten Bedingungen liegen vor, wenn die Meßlösungen je 1 ml Wasser (Molybdänlösung), 1 ml 1-n Salzsäure und insgesamt 8 ml Methanol/10 ml Meßlösung enthalten. Bei höheren Säure- bzw. niedrigeren Methanolkonzentrationen nimmt die Extinktion langsam ab. Enthalten die Meßlösungen weniger als 5 bis 6 ml Methanol, so tritt bereits eine Ausfällung der Farbstoffe ein, so daß Messungen in diesem Bereich unmöglich sind. Es ist daher nötig, daß die Messungen bei einer möglichst hohen Methanolkonzentration ausgeführt werden.

7. Einfluß der Zeit, Temperatur und Reihenfolge der Reagenzienzugabe

Die Farbentwicklung erreicht schon innerhalb von 5 Minuten nach Zusatz der Farbstoffe ihre volle Intensität, die erst nach 24 Stunden wieder abnimmt. Im Temperaturbereich von 15 bis 30° C ändert sich die Extinktion der Lösung praktisch überhaupt nicht. Die Reihenfolge der Reagenzienzugabe hat keinen Einfluß auf die Meßergebnisse.

8. Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes

Die Lösungen enthielten: 0 bis 200 μg Molybdän gelöst in 2 ml 0,5-n Salzsäure, 3 ml der 0,1%igen Farbstofflösungen und den auf 10 ml fehlenden Rest an Methanol. Diese Lösungen wurden dann bei den Wellenlängen der maximalen Extinktionen gegenüber analog hergestellten Reagensleerlösungen gemessen. Die Resultate dieser Messungen sind als Eichkurven in Abb. 3 wiedergegeben.

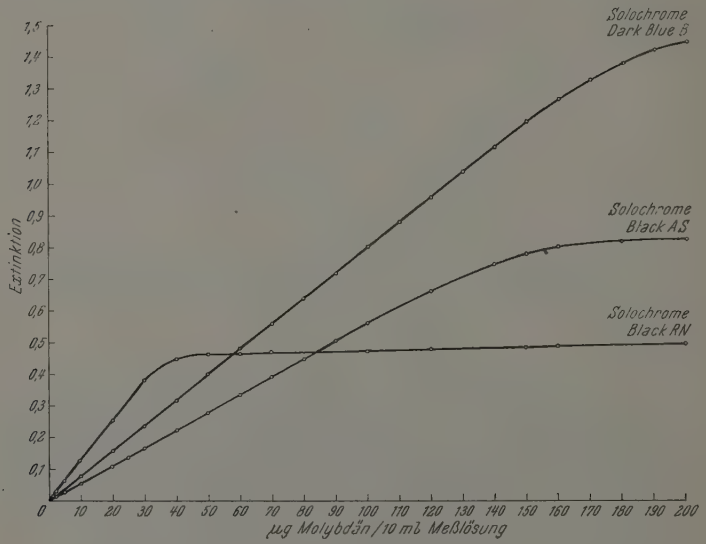


Abb. 3

Wie daraus ersichtlich ist, wird das Lambert-Beersche Gesetz in den Konzentrationsbereichen von 0 bis 30 μg (Solochrome Black RN), 0 bis 100 μg (Solochrome Black AS) und 0 bis 150 μg Molybdän (Solochrome Dark Blue B)/10 ml Meßlösung erfüllt.

9. Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methoden

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, lassen sich noch 1 μg Molybdän/10 ml Meßlösung (Solochrome Black RN) sowie 2 μg Molybdän/10 ml Meßlösung (Solochrome Black AS und Solochrome Dark Blue B) mit hoher Genauigkeit bestimmen. Der mittlere prozentuelle Fehler beträgt $\pm$ 3% (Solochrome Black RN), $\pm$ 5% (Solochrome Dark Blue B) und $\pm$ 7% (Solochrome Black AS). Sind weniger als 1 bzw. 2 μg Molybdän/10 ml anwesend, so kann der Fehler unter Umständen mehr als $\pm$ 10% betragen.

10. Einfluß von Fremdionen

Aus einer Reihe von Versuchen ging hervor, daß folgende Fremdionen die Molybdänbestimmung mit den drei Azofarbstoffen nicht stören: Al, Ni, Cr(III), Co, Ca, Ba, Pb, Bi(III), Zn(II), U(VI), Th(IV), Sr, Mn(II), Cd, Mg, As(III), Hg(II), Cl^-, SO_4^{2-}, NO_3^-, F^-, Br^- und J^-.

Störungen werden hervorgerufen durch die Ionen: Cu(II), Fe(III), Zr(IV), Hf(IV), Ti(IV), V(V), Nb(V), Ta(V), Sn(II), Sb(III) und Phosphationen.

Durch Zugabe von Ascorbinsäure und ÄDTA lassen sich selbst Milligrammengen Cu(II), Fe(III), Zr und Hf reduzieren bzw. maskieren (vgl. S. 564), wodurch sich ihr störender Einfluß auf die Molybdänbestimmung vollständig eliminieren läßt. Bei Anwesenheit der anderen störenden Elemente muß das Molybdän vor seiner spektrophotometrischen Bestimmung abgetrennt werden.

11. Arbeitsvorschrift

Der Rückstand der auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampften molybdänhaltigen Lösung wird unter gelindem Erwärmen portionenweise in insgesamt 2 ml 0,5-n Salzsäure aufgenommen und gleichzeitig in einen 10-ml-Meßkolben gebracht. Anschließend wird mit etwa 4 ml Methanol nachgespült und einige Kristalle Ascorbinsäure zur Reduktion gegebenenfalls anwesenden Eisens und 0,1 ml einer 0,1-m ÄDTA-Lösung zur Maskierung von Zirkonium- und Hafniumionen zugesetzt. Hierauf werden 3 ml 0,1%ige Farbstofflösung (Solochrome Black RN, wenn nur sehr wenig, Solochrome Black AS oder Solochrome Dark Blue B, wenn mehr Molybdän erwartet wird) zugesetzt, mit Methanol zur Marke aufgefüllt und die Extinktion der Lösung gegenüber einer analog hergestellten Reagensblindlösung bei 560, 600 bzw. 610 nm gemessen. Aus der gemessenen Extinktion wird dann mit Hilfe der Eichkurven (Abb. 3) der Molybdängehalt der Lösung ermittelt.

Zusammenfassung

Drei sehr empfindliche und genaue spektrophotometrische Bestimmungsmethoden für Mikrogrammengen Molybdän werden beschrieben. Als photometrische Reagenzien dienen die Azofarbstoffe Solochrome Dark Blue B, Solochrome Black RN und Solochrome Black AS. Diese bilden mit Molybdän in salzsaurem, methanolischem Medium blaugefärbte Komplexe, die selbst bei Anwesenheit von Ascorbinsäure und ÄDTA beständig sind. Dadurch ist es möglich, den störenden Einfluß anderer Ionen, z. B. des Kupfers, Eisens und Zirkoniums (Hafniums) auszuschalten. Mit diesen Methoden lassen sich noch 1,0 bis 2,0 μg Molybdän/10 ml Meßlösung mit relativ hoher Geschwindigkeit bestimmen.

Summary

A description is given of three sensitive and precise methods for the spectrophotometric determination of microgram quantities of molybdenum. The azo dyes: Solochrome Dark Blue B, Solochrome Black RN, Solochrome Black AS, serve as the photometric reagents. They react with molybdenum in hydrochloric acid-methanol medium to yield blue complexes, which are stable even in the presence of ascorbic acid and EDTA. The interfering action of other ions is averted in this way, for example the effect of copper, iron, and zirconium. As little as 1.0 to 2.0 μg of molybdenum per 10 ml of test solution can be determined by this method with relatively high accuracy.

Résumé

On décrit trois méthodes exactes et très sensibles pour doser par spectrophotométrie des quantités de molybdène de l'ordre du microgramme. On utilise comme réactifs photométriques les colorants azoïques solochrome bleu foncé B, noir solochrome RN et noir solochrome AS. Ceux-ci forment avec le molybdène, en milieu méthanol-acide chlorhydrique, des complexes colorés en bleu qui sont stables en présence d'acide ascorbique et d'EDTA. Il est ainsi possible d'écarter l'influence gênante d'autres ions, par exemple celle du cuivre, du fer et du zirconium. A l'aide de cette méthode, on peut doser avec une exactitude relative élevée jusqu'à 1,0 à 2,0 μg de molybdène par 10 ml de solution à doser.

Literatur

[1] *J. Korkisch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1962**, im Druck.
[2] *J. Korkisch* und *A. Farag*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 646.
[3] *J. Korkisch* und *Maher Osman*, Z. analyt. Chem. **171**, 349 (1959).

Inorganic Chemistry Laboratory, University College of Science, Calcutta-9, India

Dalzin (Diallyl-Dithio-Carbamido Hydrazine) as a Micro-Reagent. I.

Determinations of Copper, Zinc and Nickel and Their Separations

By

N. K. Dutt and **A. Dutta Ahmed**

(Received February 15, 1960)

The reagent has been used by one of us *(Dutt)* and *K. P. Sen Sarma*[1,2] for the gravimetric determination of bivalent metals like Cu, Ni, Zn, Hg, Pb, Pd and Ag on the macro scale. The low percentage content of metal in the compounds and the accuracy of the results obtained in the macro methods suggested that Dalzin might be used as a micro-gravimetric reagent.

The method has to be modified to make it suitable for application on the micro scale. The p_H of the solution is maintained rigorously by the use of a buffer solution. The modified method employs more precisely determined conditions and is also simpler.

Precipitations were carried out in a micro-beaker and filtration and washing were effected by an Emich asbestos packed filter-stick. The beaker with the filter-stick containing the precipitate was dried in a Benedetti-Pichler drying apparatus in a current of air. Weighings were done on a Mettler Single-Pan Micro-Balance. E. Merck pro-analysis chemicals were used. For measuring solutions for determinations, a micro-burette calibrated in $^1/_{100}$ths of a ml was used.

Determination of Cu

Cu-Dalzinate is quantitatively precipitated between p_H 3–6. A citrate buffer of p_H 4.0 (a molar solution, corresponding to mono-sodium citrate) was used.

To a measured volume of copper solution in a micro-beaker, dilute ammonia solution was added dropwise to the first precipitation of $Cu(OH)_2$. The turbidity was just cleared by 0.1 *N* H_2SO_4 and 0.05–0.10 ml were added in excess. To this was added 1 ml of the buffer solution followed by a slight excess of the reagent (0.5% in alcohol) with frequent rotation of the beaker during the addition. The precipitate was allowed to settle and was collected at one side of the beaker. The supernatant solution was then drawn off through an Emich asbestos filter-stick, the precipitate sucked as dry as possible, washed seven to eight times with 0.5- to 0.7-ml portions of cold water and finally thrice with methyl alcohol (0.5- to 1.0-ml portions) to free it from the reagent. The beaker with the precipitate and the filter-stick was first heated by placing it for a minute or two on the boiling water bath to remove all adhering water and alcohol. It was finally dried for 15 minutes in a current of air at 110°–112° C in the Benedetti-Pichler drying apparatus. The beaker with the precipitate and the filter-stick was then weighed in the micro-balance after taking the usual precautions of wiping with moist flannel and dry chamois respectively as prescribed for micro methods. Copper was weighed as $Cu(C_8H_{12}N_4S_2)$ (Cu: 21.77%). Results are shown in Table I.

Table I

No. of observations	mg Cu-Dalzinate	mg Cu		mg Error
		Found	Present	
1	0.177	0.039	0.041	— 0.002
2	0.561	0.122	0.122	± 0.000
3	1.413	0.308	0.306	+ 0.002
4	1.891	0.412	0.408	+ 0.004
5	2.342	0.510	0.510	± 0.000
6	0.934	0.203	0.204	— 0.001

The bulky nature of the precipitate prevents working with a solution containing more than 1 mg of copper by micro methods. On the other hand as little as 0.04 mg of Cu has been accurately determined by this method.

Determination of Zn

Zn-Dalzinate is quantitatively precipitated between p_H 7.5 and 8.6. The precipitations are carried out at p_H 8.3 using $NaHCO_3$ solution to maintain this value.

A measured volume of Zn solution was added to a micro-beaker. Dilute ammonia was added until $Zn(OH)_2$ precipitated. The precipitate was just dissolved with drops of 0.1 *N* H_2SO_4 (the p_H of solution at this stage should be just below 7), heated on a water bath and then a slight

excess of the reagent solution was added with frequent rotation of the beaker during addition, followed by $NaHCO_3$. The beaker was again heated on a water bath and the precipitate was allowed to settle. The rest of the operation was same as before. Final washings were, however, done with 2–3 ml (total) acetone to free the precipitate from the reagent. Zn was weighed as $Zn(C_8H_{12}N_4S_2)$ (Zn: 22.26%). Results are shown in Table II.

Table II

No. of observations	mg Zn-Dalzinate	mg Zn		mg Error
		Found	Present	
1	0.242	0.054	0.056	— 0.002
2	0.628	0.140	0.140	± 0.000
3	1.004	0.224	0.223	+ 0.001
4	1.236	0.275	0.279	— 0.004
5	1.502	0.334	0.335	— 0.001
6	2.009	0.447	0.446	+ 0.001
7	2.512	0.559	0.558	+ 0.001
8	3.529	0.786	0.781	+ 0.005
9	4.518	1.006	1.004	+ 0.002

Determination of Ni

Ni is quantitatively precipitated by the reagent in the range p_H 8–9. The precipitations were carried out at p_H 8.3 as in the case of Zn using $NaHCO_3$ solution. The entire procedure was same as above (cf. Zn). Ni was weighed as $Ni(C_8H_{12}N_4S_2)$ (Ni: 20.35%). Results are shown in Table III.

Table III

No. of observations	mg Ni-Dalzinate	mg Ni		mg Error
		Found	Present	
1	0.344	0.070	0.071	— 0.001
2	0.683	0.140	0.141	— 0.001
3	1.399	0.286	0.283	+ 0.003
4	2.128	0.435	0.438	— 0.003
5	2.775	0.567	0.565	+ 0.002
6	3.473	0.710	0.707	+ 0.003

Separations and Determinations of Cu and Zn and of Cu and Ni

Aliquot parts of Cu-solution and Zn-solution (or Ni-solution) were added to a micro-beaker, dilute ammonia solution was added till precipitation just began, then 1 ml of Citrate Buffer of p_H 4 was added followed by slight excess of the reagent. Cu-Dalzinate precipitated and Cu was determined as above.

The filtrate was concentrated to 1 ml. To the hot solution a slight excess of the reagent was added followed by 1 ml of *N* NaOH to convert H_2Cit^{-1} to Cit^{-3}. Finally the p_H was maintained by the addition of $NaHCO_3$ and Zn (or Ni) was determined as usual. Results are shown in Table IV.

Table IV

No. of observations	Soln. of	mg of compound	Found mg	Present mg	Error mg
1	Cu	1.501	0.327	0.326	+ 0.001
	Zn	0.751	0.167	0.167	± 0.000
2	Cu	1.032	0.225	0.224	+ 0.001
	Zn	2.012	0.448	0.446	+ 0.002
3	Cu	3.070	0.668	0.672	— 0.004
	Zn	0.753	0.168	0.167	+ 0.001
4	Cu	0.712	0.155	0.155	± 0.000
	Zn	2.766	0.616	0.614	+ 0.002
5	Cu	3.082	0.671	0.672	— 0.001
	Zn	0.506	0.113	0.112	+ 0.001
6	Cu	0.474	0.103	0.103	± 0.000
	Zn	2.771	0.617	0.614	+ 0.003
7	Cu	1.408	0.307	0.306	+ 0.001
	Ni	1.889	0.386	0.388	— 0.002
8	Cu	3.265	0.711	0.714	— 0.003
	Ni	0.708	0.145	0.141	+ 0.004
9	Cu	0.404	0.083	0.082	+ 0.001
	Ni	2.035	0.416	0.424	— 0.008
10	Cu	1.866	0.406	0.408	— 0.002
	Ni	1.023	0.209	0.212	— 0.003
11	Cu	1.317	0.287	0.285	+ 0.002
	Ni	2.756	0.563	0.565	— 0.002

When Cu, Zn and Ni are present together, Cu can be determined successfully as usual. However, from the filtrate Zn and Ni can not be separated as both are precipitated in the same range of p_H. In the determination of copper, alkali metals, Ag, Mg, Be, Ca, Sr, Ba, Zn, Cd, Sn, Pb, Bi, Co, Ni, Mn, ZrO^{2+}, Fe, Al, UO_2, Rare earths, Th, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, WO_4^{2-}, VO_3^- do not interfere. In the determinations of zinc and nickel, Cu, Pb, Pd, Hg, Ni, Ag interfere which need to be separated first. The other cations, mentioned above, do not interfere in presence of citric acid. (Unpublished data in the macro method, also cf. Ref. 2.)

Summary

Methods for the gravimetric micro-determination of copper, zinc and nickel separately and separations of Cu—Zn and Cu—Ni, using diallyl dithiocarbamido-hydrazine as reagent, are described. Separation is achieved by p_H-control.

Zusammenfassung

Verfahren zur getrennten, gravimetrischen Mikrobestimmung von Kupfer, Zink und Nickel sowie zur Trennung von Kupfer und Zink bzw. Kupfer und Nickel mit Hilfe von Diallyldithiocarbamidohydrazin als Fällungsreagens werden beschrieben. Die Trennungen lassen sich durch Einhaltung bestimmter p_H-Werte erzielen.

Résumé

On décrit des méthodes de microdosage gravimétrique du cuivre, du zinc et du nickel séparément et des méthodes de séparation de Cu—Zn et de Cu—Ni, en utilisant comme réactif la diallyl dithiocarbamido hydrazine. La séparation s'effectue à p_H donné.

References

[1] *N. K. Dutt* and *K. P. Sen Sarma*, Analyt. Chim. Acta **15**, 21 (1956).
[2] *N. K. Dutt* and *K. P. Sen Sarma*, Analyt. Chim. Acta **15**, 102 (1956).

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch

Über einen neuen Mikroverbrennungsautomaten zur serienmäßigen C-, H- und N-Bestimmung*

Von

W. Knobloch, F. Knobloch und **G. Mai**

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 5. März 1961)

In den letzten Jahrzehnten wurde die Entwicklung von Mikroverbrennungsöfen durch die Arbeitsmethoden von *Pregl* bestimmt. Vielfältige Verbesserungen und apparative Feinheiten wurden zur Erreichung eines Höchststandes an Leistungsfähigkeit der Verbrennungsautomaten erprobt. Bei hohen Anforderungen, besonders in Hinsicht auf die Anzahl der pro Tag durchführbaren Analysen, setzen die genannten Methoden eine bestimmte Grenze.

Erst in den letzten 15 Jahren gelang es tschechischen Autoren, neue Verfahren zu erarbeiten. *Večeřa*[1] führte das Co_3O_4 und *Horaček* und *Körbl*[2] das Silberpermanganat zur Schnellbestimmung von C, H und N in die Mikroelementaranalyse ein.

Schon *Kurtenacker*[3] und *Russanewitsch*[4] beschrieben 1911 bzw. 1936 die vorzüglichen Eigenschaften dieser Verbrennungskatalysatoren, ohne sie einer breiteren Anwendung zuführen zu können. Für das Co_3O_4 von *Večeřa*, das eine extrem hohe Verbrennungsgeschwindigkeit gestattet, haben wir einen Serienbestimmungsautomaten entwickelt, der es einer Person ermöglicht, an einem Arbeitstag 26 bis 32 Verbrennungen durchzuführen. Der dazu notwendige Arbeitsaufwand ist nicht viel höher als bei den bisher üblichen Geräten.

Beschreibung des Gerätes

Auf der Oberseite des Gehäuses sind parallel zwei verkürzte Quarzrohre angebracht, in denen die Substanzen gleichzeitig oder auch einzeln ver-

* Zum Patent in mehreren Ländern angemeldet.

brannt werden (*A*). Als feststehende Öfen (*B*) dienen zwei 6 cm lange Heizpatronen (Betriebstemperatur 750°), die mit einer Bajonettkupplung im Gehäuse angeschlossen sind. Als bewegliche Verbrennungsöfen (*C*)

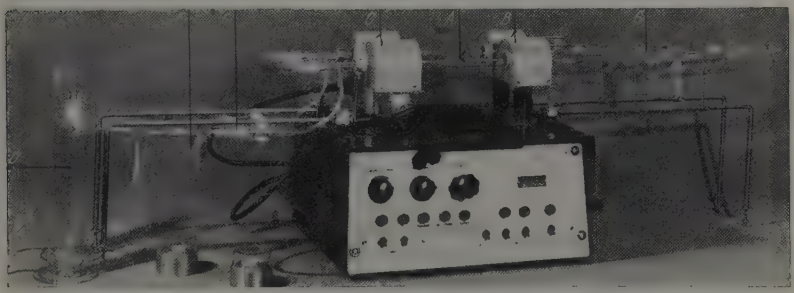


Abb. 1. Gesamtansicht des Verbrennungsautomaten
A Verbrennungsrohre, *B* feststehende Öfen, *C* Verbrennungsöfen, *D* Druckregler, *E* Vorreinigungsblasenzähler, *F* Vorreinigungsrohr, *G* Absorptionsröhrchen

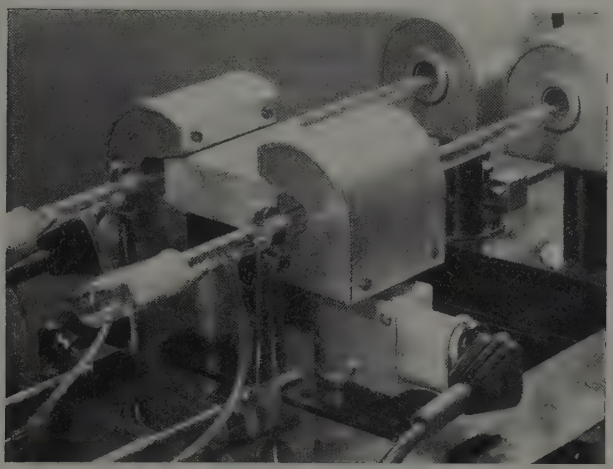


Abb. 2. Verbrennungsöfen in Betriebsstellung

(Betriebstemperatur 900°) sind zwei Dreiviertelschalen auf einem Führungsschlitten angebracht. Diese beiden Schalenöfen sind gegenläufig verschiebbar und werden in Betriebsstellung durch einen regelbaren Elektromotor angetrieben, können aber auch mit einem Handrad bewegt werden. Durch eine besondere Vorrichtung ist es möglich, den Schlitten auch

während der automatischen Verbrennung von Hand zurückzufahren, ohne den elektrischen Antrieb zu unterbrechen. Der Sauerstoffvorreinigungsofen ist an der Rückseite des Gehäuses nach dem gleichen Prinzip wie die feststehenden Öfen, mit denen er konstruktiv identisch ist, angebracht. An beiden Schmalseiten des Gehäuses sind je zwei Führungsschienen befestigt, die zur Anbringung der benötigten Vorreinigungs- und Absorptionsröhrchen dienen.

Sämtliche Schlauchverbindungen, soweit sie unentbehrlich sind, bestehen aus Polyäthylen- oder PVC-Schläuchen. Störungen wurden hierbei nicht beobachtet. Alle weiteren Einzelheiten gehen aus der Abbildung hervor.

Methodik

Die Rohrfüllung erfolgt in der üblichen Weise, wie sie bei *Večera* angegeben ist. Co_3O_4 auf Silikagel hat sich bei unseren Versuchen am besten bewährt. Hiermit ist auch der Sauerstoffvorreinigungsofen beschickt. An diesen schließen sich die Druckregler, die Blasenzähler und die Vorreinigungsröhrchen an. Die Blasenzähler sind mit 100%iger H_2SO_4 oder Chromschwefelsäure gefüllt. Die Wasser- und Kohlendioxydabsorptionsröhrchen sind in ihren Abmessungen identisch und zur leichteren Handhabung beim Füllen mit NS 14,5 ausgestattet. Zur Stickoxydadsorption wurden Blasenzähler mit 100%iger Schwefelsäure benutzt. Der Automat arbeitet mit Sauerstoffüberdruck, so daß weitere Zubehörteile entfallen.

Um das lästige Nachverbrennen zur Koksbildung neigender Substanzen zu vermeiden, wurde eine Nachglühzeit oder „Standzeit" der Verbrennungsöfen eingeführt. Es hat sich gezeigt, daß bei fast allen Verbrennungsautomaten beim Auflaufen der beweglichen Öfen an den Langbrenner eine wenn auch nur wenige Millimeter breite „kalte" Zone entsteht, die unter Umständen zur Bildung von Koksrückständen oder sogenannten Kohlespiegeln Anlaß gibt. Durch verschiedene Kunstgriffe, wie Entgegenlaufen oder Mitlaufen des Langbrenners sowie Einbringung eines Saugpfropfens vor den Katalysator u. a., hatte man versucht, diesen Übelstand zu beseitigen. Wir haben gefunden, daß durch eine Nachglühzeit der an die feststehenden Öfen aufgelaufenen Verbrennungsöfen, die empirisch für die jeweilige Substanz ermittelt wird, die Bildung von Rückständen restlos ausgeschaltet werden kann. Auch bei schwerst verbrennbaren Substanzen konnte dergleichen nicht beobachtet werden. Das Quarzrohr bleibt auch nach mehreren hundert Verbrennungen immer blank. Die Nachglühzeit ist bei dem Gerät an dem an der Vorderfront befindlichen Knopf „Standzeit" in Minuten einstellbar.

Nach Beschicken der Verbrennungsrohre, Anbringen der Adsorptionsgefäße und Einstellen der Vorschubgeschwindigkeit werden die Ver-

brennungsöfen geschlossen und durch Betätigung des „Start"-Knopfes die Automatik eingeschaltet. Von diesem Moment an bedarf der Apparat keinerlei Beaufsichtigung mehr. Wenn die beweglichen Öfen an die Langbrenner auflaufen, ertönt ein 8 Sekunden langer Summerton, der die Beendigung dieser Phase der Verbrennung anzeigt. Nach Ablauf der vorher eingestellten Standzeit fahren die Öfen automatisch auseinander und die Apparatur schaltet nach kurzer Zeit ab.

Bei Einwaagen von 2 bis 4 mg genügt eine Verbrennungszeit von 6 Minuten und eine Durchspülzeit von weiteren 6 Minuten, einschließlich der Standzeit. Daraus ergibt sich, daß in 12 Minuten zwei Parallelverbrennungen durchgeführt werden können.

Um eine volle Ausnutzung der Vorteile des Gerätes zu gewährleisten, wurde auch eine neue Wägetechnik ausgearbeitet. Als Waage stand uns eine Mikroanalysenwaage M 5 der Firma Mettler zur Verfügung. Diese Waage gestattet ein außerordentlich schnelles Wägen bei hoher Nullpunktkonstanz. Es ist bekannt, daß die Konstanz um so größer ist, je mehr sich die Raumtemperatur der Körpertemperatur des Wägenden annähert. Wir arbeiten im Durchschnitt bei 25 bis 27°. Die Waage steht dabei im gleichen Raum wie die Apparatur. Die Absorptionsröhrchen werden nach dem Füllen mit Ascarite (Natronasbest) bzw. Magnesiumperchlorat peinlichst gesäubert und vorschriftsmäßig feucht und trocken gewischt. Von diesem Moment an werden die Röhrchen nur noch mit Baumwoll- oder Rehlederhandschuhen angefaßt. Die Anwendung von Handschuhen hat mehrere Vorteile: sicheres Handhaben der diffizilen Glasteile, Verhinderung der Feuchtigkeits- und Wärmeabgabe der Hände sowie Verhinderung unkontrollierbarer statischer Aufladungen der Absorptionsgefäße, die sehr oft eine Nullpunktverschiebung der Waagen vortäuschen. Eine Kontrolle dieser Erscheinung ist durch ein neben der Waage an einem Seidenfaden aufgehängtes Holundermarkkügelchen möglich.

Nach Beendigung einer Verbrennung werden die Röhrchen an der Eingangsseite mit kleinen Schliffstöpseln verschlossen und auf ein Gestell neben die Waage gelegt. Nach 5 Minuten wird das erste H_2O-Röhrchen ohne Stöpsel in die Waage gebracht und nach weiteren 5 Minuten gewogen. Währenddessen liegt bereits das erste CO_2-Röhrchen in der Waage und so fort. Einschließlich Einwaage und Berechnung der Analysenwerte werden im Durchschnitt 30 Minuten für eine Doppelbestimmung benötigt.

Die Werte sind äußerst genau und liegen sehr oft nahe am theoretischen Sollwert. Die zulässige Fehlergrenze wurde bei einwandfrei vorbereiteten Substanzen niemals überschritten. Objektive Fehler konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Besonders hervorzuheben ist noch die Möglichkeit, sogenannte Gabelanalysen, bei denen eine bekannte Substanz, dann die unbekannte Verbindung und zum Schluß nochmals die bekannte Substanz verbrannt werden, in zwei Parallelverbrennungen auszuführen.

Hierbei wird zunächst das Rohr *A* mit der bekannten, Rohr *B* mit der unbekannten Substanz beschickt und verbrannt. Im zweiten Durchgang werden die Rohre in umgekehrter Reihenfolge beschickt. Bei kostbaren Substanzen, von denen nur sehr kleine Mengen zur Verfügung stehen, ist so eine hohe Sicherheit der Ergebnisse gewährleistet.

Stickstoffbestimmung

Außer zur C-H-Analyse läßt sich das Gerät auch zur Stickstoffschnellbestimmung verwenden. Die Verbrennungsrohre werden durch zwei um 10 cm längere ersetzt, die eine 10 cm lange Schicht red. Kupfer im vorderen Rohrende haben. Diese Schicht ragt vorn aus den feststehenden Öfen heraus. Zur Heizung der Reduktionszone werden kleine Aluminiumblöcke, die mit einer Bohrung für das Verbrennungsrohr versehen sind, mit zwei Kupferstiften an die feststehenden Öfen angesteckt. Die Wärmeüberleitung durch die Kupferstifte ist genügend groß, um eine sichere Reduktion der Stickoxyde zu gewährleisten. Die Verbrennung erfolgt im Pt-Schiffchen im Kohlenstoff-Sauerstoff-Strom an Co_3O_4. Das benötigte Kohlendioxyd wird einer handelsüblichen Stahlflasche entnommen. Verunreinigende Gase werden durch schnelles Abblasen der Flasche auf 40 at entfernt. Eventuell noch auftretende Blindwerte spielen keine Rolle, da die Verbrennungszeit und die Gasmenge, die die Rohre passiert, fixiert sind. Diese Blindwerte werden bei der Auswertung einfach abgezogen. Bei Einwaagen von 3 bis 5 mg genügen 6 Minuten für die Verbrennung; für Nachglühen und Spülen ebenfalls 6 Minuten, bei hohen Stickstoffgehalten etwas mehr. Mit dieser Anordnung können drei bis vier Doppelbestimmungen pro Stunde durchgeführt werden.

Zusammenfassung

Es wird ein neuer Mikroverbrennungsautomat zur serienmäßigen C-, H- und N-Bestimmung beschrieben. Durch Parallelverbrennungen in zwei Verbrennungsrohren mit Co_3O_4-Katalysator nach *Večeřa* und eine zeitlich gesteuerte Nachglühzeit bei schwer verbrennbaren Substanzen können 26 bis 30 Verbrennungen pro Tag durchgeführt werden. Die Verbrennungsöfen können auch während des automatischen Vorschubs angehalten oder rückwärts bewegt werden, ohne daß der elektrische Antrieb unterbrochen werden muß. Die Wägegenauigkeit konnte durch eine verbesserte Wägetechnik erhöht werden. Das Wischen der Röhren z. B. wird durch die Benutzung von Handschuhen vermieden. Die Behandlung der Absorptionsröhren vor und während der Wägung wird beschrieben. Die Durchführung der Stickstoffbestimmung wurde ebenfalls so vereinfacht, daß mit diesem Apparat drei bis vier Doppelbestimmungen

pro Stunde durchgeführt werden können. Das Gerät ermöglicht eine Leistungssteigerung um das Zwei- bis Dreifache gegenüber den bisher gebräuchlichen Geräten.

Summary

A new automatic micro combustion apparatus is described for serial C-, H-, and N-determinations. As many as 25 to 30 combustions can be completed daily if two parallel combustions are conducted in two combustion tubes with the Co_3O_4 catalyst after *Večeřa* and if an automatically timed aftercombustion period is used in the case of materials which burn with difficulty. The combustion furnaces can be stopped or moved backward even during the automatic advance without need for interrupting the electrical propulsion. The precision of the weighing was enhanced by an improved weighing technique. Wiping of the tubes etc. was avoided by using gloves. A description is given of the manipulation of the absorption tubes prior to and after the weighing. The procedure for determining nitrogen was also simplified in such wise that 3 or 4 determinations can be accomplished with this apparatus per hour. The setup permits an output that is two or three times as great as that delivered by the apparatus employed hitherto.

Résumé

On décrit un nouveau appareil automatique pour le microdosage en série de C, H et N. En effectuant des combustions en parallèle dans deux tubes à combustion, avec Co_3O_4 comme catalyseur suivant *Večeřa*, et une durée de recuit contrôlée, on a pu réaliser 25 à 30 combustions par jour, avec des substances difficilement combustibles. On peut aussi arrêter les fours à combustion pendant l'avance automatique ou les faire revenir en arrière, sans avoir à interrompre l'impulsion électrique. On peut augmenter la précision de la pesée par une technique de pesée améliorée. Par exemple, on évite le frottement des tubes par l'emploi de gants. On décrit la manipulation des tubes à absorption avant et pendant la pesée. On a simplifié de la même façon l'exécution du dosage de l'azote, de sorte qu'avec cet appareil on peut effectuer 3 à 4 dosages des deux éléments par heure. L'appareil permet une augmentation du rendement du travail de 2 à 3 fois par rapport aux appareils utilisés jusqu'à maintenant.

Literatur

[1] *M. Večeřa* und *L. Synek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1960**, 208; *M. Večeřa*, *D. Šnobl* und *L. Synek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 9.

[2] *J. Horáček* und *J. Körbl*, Mikrochim. Acta [Wien] **1959**, 303.

[3] *A. Kurtenacker*, Z. analyt. Chem. **50**, 548 (1911).

[4] *N. F. Russanewitsch*, J. Gen. Chem. USSR **6**, 520 (1936); zitiert nach Chem. Zbl. **1936**, II, 2066.

Aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der Universität Graz

Über die Extrahierbarkeit von Metallverbindungen aliphatischer Arson- und Arsinsäuren mit organischen Lösungsmitteln

Von
R. Pietsch und E. Pichler

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 29. März 1961)

Erstmals wurde bei der Bearbeitung des analytischen Verhaltens aliphatischer Arsonsäuren festgestellt, daß diese Verbindungen gegenüber einer Reihe dreiwertiger Metalle maskierende Wirkung aufweisen[1]. Diese erstreckte sich vor allem auf die Verhinderung einer Hydroxydfällung.

Bei der Untersuchung des Verhaltens aliphatischer Arsinsäuren konnte bei den gleichen Metallen, gegenüber denen Arsonsäuren die erwähnte Maskierungswirkung zeigten, ein analoges Verhalten beobachtet werden[2]. Darüber hinaus tritt diese Maskierung auch gegenüber einer Reihe zweiwertiger Metalle auf, so daß also im Vergleich zu den Arsonsäuren eine Ausweitung der maskierenden Wirkung festzustellen ist.

Da es sich jedoch bei den entstandenen Metallverbindungen, namentlich der Arsinsäuren, in denen die aktive Arsensäuregruppe maximal nur mehr einen einzigen durch Metall ersetzbaren Wasserstoff enthält, vermutlich nicht um gewöhnliche Salze handelt, wurde untersucht, ob sich solche Verbindungen durch organische Lösungsmittel extrahieren lassen.

Die zu den Versuchen verwendeten Arson- und Arsinsäuren wurden, wie schon früher angegeben[1], nach der Methode von *Quick* und *Adams*[3] oder in Anlehnung an diese Methode hergestellt. Die Kontrolle der Reinheit erfolgte durch Arsenbestimmungen, die mit den theoretisch errechneten Arsenwerten der Verbindungen in den üblichen analytischen Grenzen übereinstimmten.

Qualitative Untersuchungen

Als Extraktionsmittel wurden Chloroform und Benzol verwendet, die in ähnlichen Fällen sehr häufig angewendet werden. Die Versuche wurden im einzelnen nach der folgenden Arbeitsweise ausgeführt:

In einem Volumen von 50 ml wurden zu jeweils 0,8 Millimol der untersuchten Säuren eine Auswahl von vier Metallsalzen in der Menge von je 0,1 Millimol der einzelnen Salze in einem Scheidetrichter zugesetzt. Hierauf wurden diese Lösungen unter Zuhilfenahme von Mercks Universalindikatorpapier mit Natronlauge auf ein p_H von 4,7 bzw. 10 eingestellt. Je nachdem traten die Fällungen der Metallsalze mit den jeweiligen Säuren ein oder nicht. Zu den Lösungen wurden hierauf 30 ml Chloroform oder Benzol zugegeben und geschüttelt. Nach Trennung der Schichten, die nicht in allen Fällen gleich gut erfolgte, wurden die organischen Extraktionsmittel abgetrennt, wobei sie in manchen Fällen filtriert werden mußten. Es war jedoch auch nach längerem Stehen, selbst bei Verwendung von Blaubandfiltern nicht immer möglich, eine vollkommen klare organische Phase zu erhalten.

Das organische Lösungsmittel wurde hierauf abdestilliert, der Rückstand mit heißer Salzsäure aufgenommen und qualitativ untersucht.

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser qualitativen Versuche mit aliphatischen Arsonsäuren wiedergegeben.

Tabelle 1

Alkylarsonsäure	Metall zugegeben	Im Extraktionsrückstand gefunden					
		aus Benzol			aus Chloroform		
		p_H 4	p_H 7	p_H 10	p_H 4	p_H 7	p_H 10
Methyl-	Cr^{3+}, Be^{2+} Co^{2+}, Cu^{2+} Al^{3+}, Fe^{3+} Ni^{2+}, Cd^{2+}	—	—	—	—	—	—
Äthyl-		—	—	—	—	—	—
n-Propyl-		—	—	—	—	—	—
n-Butyl-		—	—	—	Cr^{3+}, Fe^{3+}	—	—
i-Butyl-		—	—	—	Cr^{3+}, Fe^{3+} Be^{2+}, Al^{3+}	—	—
i-Amyl-		Cr^{3+}, Be^{2+} (Fe^{3+})	—	—	Al^{3+}, Co^{2+} (Fe^{3+})	—	—

Wie zu sehen ist, wurden außer den ersten vier Gliedern der homologen Reihe der normalen Arsonsäuren auch die i-Butylarsonsäure und i-Amylarsonsäure in die Untersuchungen einbezogen. Dies hatte seinen Grund darin, daß bei der n-Butylarsonsäure eine, wenn auch sehr geringe, so doch deutliche Extraktion zu bemerken war. Durch die Erweiterung um ein weiteres Glied der Reihe und die Ausdehnung auf die Isobutylarsonsäure konnten diese Ergebnisse erhärtet werden.

Die in Klammern gesetzten Angaben bedeuten, daß im Extrakt nur ganz geringe Spuren, zudem infolge der manchmal schwierig zu erzielenden klaren Filtration der organischen Phase unsicher, gefunden wurden.

Wie man aus der Tabelle entnimmt, treten die Extraktionen nur im sauren p_H-Gebiet auf. Sie sind mit Chloroform weit besser durchführbar als mit Benzol.

In gleicher Weise wie bei den Arsonsäuren wurde auch bei den Arsinsäuren die qualitative Bearbeitung durchgeführt und zeigte das in der Tabelle 2 angeführte Ergebnis:

Tabelle 2

Alkylarsinsäure	Metalle zugegeben	Im Extraktionsrückstand gefunden					
		aus Benzol			aus Chloroform		
		p_H 4	p_H 7	p_H 10	p_H 4	p_H 7	p_H 10
Dimethyl-	Cr^{3+}, Be^{2+}, Co^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}	—	—	—	—	—	—
Diäthyl-		—	—	—	—	—	—
Di-n-propyl-		—	—	—	**Fe^{3+}**	Fe^{3+}, Be^{2+}, Cr^{3+}	—
Di-n-butyl-		Cr^{3+}	Cr^{3+}, Be^{2+}	—	**Fe^{3+}**, Cr^{3+}, **Al^{3+}**	**Fe^{3+}**, Be^{2+}, Co	—
Di-i-amyl-		**Cr^{3+}**, Be^{2+}	Cr^{3+}, Be^{2+}, Al^{3+}	—	**Fe^{3+}**, **Al^{3+}**, **Cr^{3+}**, Be^{2+}	**Fe^{3+}**, **Al^{3+}**, Co^{2+}, Cr^{3+}, Be^{2+}	—

Die halbfett gesetzten Angaben in der Tabelle bedeuten eine besonders starke Extraktion.

Wie sich aus der Tabelle sofort erkennen läßt, ist die Extrahierbarkeit der Metallverbindungen doppelt aliphatisch substituierter Arsinsäuren gegenüber den einfach substituierten Verbindungen wesentlich besser. Dies bezieht sich sowohl auf Anzahl und Menge der Metallverbindungen als auch auf das Ausmaß der Löslichkeit. Auch hier wieder ist Chloroform das bessere Lösungsmittel, und liegt das geeignete p_H-Bereich auf der sauren bis neutralen Seite.

Quantitative Untersuchungen

Zur Untersuchung des Ausmaßes der Extrahierbarkeit wurden von den qualitativ untersuchten Metallionen das Fe(III)-Ion ausgewählt, weil es sowohl in Form seiner Arson- wie auch seiner Arsinsäureverbindungen extrahierbar ist. Als Extraktionsmittel wurde Chloroform verwendet, wobei im allgemeinen die angegebene Arbeitstechnik beibehalten wurde.

Arsonsäuren

Je 24,5 mg Eisen wurden gemeinsam mit je 400 mg aliphatischer Arsonsäure in wenig Wasser gelöst, auf 80 ml verdünnt und nach Ein-

stellen verschiedener p_H-Werte mit je 20 ml Chloroform extrahiert. Die p_H-Einstellung erfolgte mit Ammoniak. Es wurden die nachfolgenden Ergebnisse erhalten:

Tabelle 3

Säure	p_H der besten Extraktion	Extrahierte Menge Fe in %
n-Propylarsonsäure ...	4	0,5
n-Butylarsonsäure	2—6	1
i-Amylarsonsäure	3	6

Die Extrahierbarkeit der freien Arsonsäuren ist in allen Fällen sehr gering und liegt unter gleichen Versuchsbedingungen unter 1%. Hingegen steigt die extrahierte Säuremenge proportional mit der extrahierten Eisenmenge an. Bei i-Amylarsonsäure wurden bei p_H 2,8 in der organischen Phase 1,5 mg Eisen neben 11,5 mg i-Amylarsonsäure gefunden, wobei in diesem Wert die Eigenextraktion der Säure in Abwesenheit von Eisen bereits berücksichtigt ist. Daraus ergibt sich für die organische Phase ein Verhältnis des Eisens zur Säure von rund 1 : 2. Dies ist im Hinblick darauf, daß bei den Arsonsäuren zwei durch Metall ersetzbare Wasserstoffe vorhanden sind, auch verständlich.

Im Vergleich dazu seien die Löslichkeitsverhältnisse der reinen Säuren in Wasser und Chloroform angegeben:

Tabelle 4

Säure	mg Säure gelöst in 1 ml gesättigter Lösung bei	
	Wasser	Chloroform
Äthylarsonsäure	leicht lösl.	
n-Propylarsonsäure ...	259	3,8
n-Butylarsonsäure	67	4,9

Bei den aliphatischen Arsonsäuren ist eine, wenn auch sehr geringe, so doch deutlich wahrnehmbare Extraktion einer Eisen(III)-verbindung festzustellen. Die Extrahierbarkeit nimmt mit dem Molekulargewicht, also mit der Größe des aliphatischen Liganden zu. Die Löslichkeit der freien Säure in Wasser nimmt mit steigendem Molekulargewicht ab, jene in Chloroform zu, allerdings nicht im gleichen Ausmaß.

Arsinsäuren

Bei der Bearbeitung der Arsinsäuren wurde an sich die gleiche Arbeitsmethode angewendet, nur wurde nicht eine festgelegte Säuremenge zugesetzt, sondern wegen der hier stärker auftretenden Unterschiede des

Molekulargewichtes, jeweils rund 2 Millimol der betreffenden Säure. Diese Säuremenge wurde mit 25,4 mg Eisen(III) in 80 ml gelöst, mit Ammoniak auf den jeweils gewünschten p_H-Wert gebracht und hierauf mit 20 ml Chloroform extrahiert.

Bei der Dimethylarsinsäure und Diäthylarsinsäure konnte im gesamten p_H-Bereich von 1 bis 9 keinerlei Eisenextraktion gefunden werden, obwohl gerade bei diesen Säuren die stärkste Maskierungswirkung in wäßriger Lösung eintritt. Dies steht auch in Übereinstimmung mit den qualitativen Vorversuchen.

Bei den höheren aliphatischen Arsinsäuren trat immer eine sehr starke Extraktion der Eisenverbindung ein. In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die erhaltenen Ergebnisse angeführt:

Tabelle 5

Di-n-propylarsinsäure		Di-n-butylarsinsäure		Di-i-amylarsinsäure	
p_H	% Fe extrahiert	p_H	% Fe extrahiert	p_H	% Fe extrahiert
1,70	2	1,30	47	1,80	92
2,62	14	2,30	86	2,80	39
3,35	60	2,90	91	4,70	26
5,20	78	3,90	81	6,70	31
6,46	86	5,35	71		
7,14	79	6,60	30		

Infolge der oft schlechten Trennung der Schichten und des nicht immer gut reproduzierbaren Nachwaschens mit reinem Extraktionsmittel darf keine allzu hohe Genauigkeit der erhaltenen Extraktionsergebnisse erwartet werden.

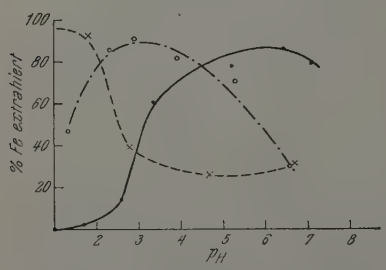


Abb. 1. Extraktionskurven der Eisenverbindungen der Di-n-Propyl- (————), Di-n-Butyl- (— · — · —) und Di-n-Amyl-Arsinsäure (- - - - - - -)

Die graphische Wiedergabe der angegebenen Extraktionsverhältnisse zeigt die Abb. 1.

Der Vergleich der Ergebnisse mit den einzelnen aliphatischen Arsinsäuren zeigt, daß mit der Di-n-propylarsinsäure die Extraktion der Eisen(III)-verbindung abrupt einsetzt. Dies erinnert daran, daß auch die Metallverbindungen der einzelnen Arsinsäuren ziemlich plötzlich von der Di-n-propylarsinsäure bzw. Di-n-butylarsinsäure an normale Salzzusammensetzung erkennen lassen. Die einmal aufgetretene Extrahierbarkeit der Eisen(III)-verbindungen vergrößert sich bei den folgenden Gliedern der Säurereihe nicht mehr wesentlich.

Dagegen ist eine starke Verschiebung des p_H-Wertes der maximalen Extrahierbarkeit mit steigendem Molekulargewicht nach stärker sauren Werten zu erkennen. Die Form der Extraktionskurven bleibt im allgemeinen gleich. Bei keiner Säure tritt ein scharfer Sprung auf.

Im Hinblick auf die Tatsache, daß Eisen(III)-verbindungen der Dimethyl- und Diäthylarsinsäure nicht extrahiert werden, läßt sich folgende Überlegung anstellen. Die Lage der Maxima in der Abb. 1 zeigt, daß im Falle einer Extrahierbarkeit der Eisen(III)-verbindungen dieser beiden Säuren deren Maxima im alkalischen Gebiet lägen und daß die Anfänge der Extraktion im Neutralgebiet wären. Aus den bereits seiner-

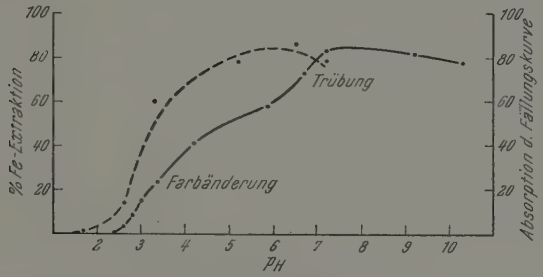


Abb. 2. Extraktionskurve (- - - - - - -) und Fällungskurve (— · — · —) der Eisenverbindung der Di-n-Propylarsinsäure

zeit[1,2] gemachten Erfahrungen ist jedoch bekannt, daß diese Verbindungen im alkalischen Gebiet nicht mehr beständig sind, sondern unter Bildung von Hydroxyd oder basischem Salz hydrolysieren.

Aber auch die Zusammensetzung der präparativ hergestellten Eisen(III)-verbindung der Di-n-propylarsinsäure zeigt an, daß es sich dabei im wesentlichen um ein Hydroxyd handelt, das ebenfalls nicht extrahierbar wäre. Tatsächlich wird jedoch die Eisen(III)-verbindung der Di-n-propylarsinsäure von Chloroform extrahiert.

Aus der früher[1] angegebenen Zusammensetzung ist zu entnehmen, daß nur 0,21 Mole Di-n-propylarsinsäure je Grammatom Eisen vorliegen und erst bei der Di-n-butylarsinsäure eine normale, die Extraktion erklärende Zusammensetzung aus 3 Molen Säure je Grammatom Eisen vorliegt. Die Folgerung, daß die Extrahierbarkeit der Eisen(III)-verbindungen mit der Zusammensetzung in engem Zusammenhang steht, ist jedoch auch hinsichtlich der Eisen(III)-verbindung der Di-n-propylarsinsäure berechtigt, wenn man die Herstellung der Präparate überlegt. Die untersuchten Präparate wurden bei einem p_H-Wert hergestellt, der über dem Maximum der Fällungskurve liegt. Die Eisenfällung mit Di-n-propylarsinsäure wurde bei p_H 8,5 durchgeführt, während das

Maximum der Extraktion der Eisen(III)-verbindung bei $p_H = 6$ liegt, also noch im schwach sauren Gebiet. Die Gegenüberstellung von Fällungskurve und Extraktionskurve des Eisen(III)-ions mit Di-n-propylarsinsäure in Abb. 2 illustriert diese Verhältnisse.

Bei p_H 6 liegt praktisch noch keine Fällung vor, während die Reaktion der Di-n-propylarsinsäure mit dem Eisen, erkennbar an der starken Farbänderung, bereits viel früher eingesetzt hat.

In ähnlicher Weise wie bei den Eisen(III)-verbindungen läßt sich auch bei anderen Metallen erkennen, daß eine Extraktion nur dann eintritt, wenn die entstehenden Verbindungen eine entsprechend normale Zusammensetzung aufweisen.

Während nach Umsetzung mit Di-n-propylarsinsäure nur wenige Metalle bei den qualitativen Untersuchungen im Extrakt gefunden wurden, sind bei Anwendung von Di-n-butylarsinsäure bereits wesentlich mehr extrahierbar. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß auch die mit Di-n-propylarsinsäure anfallenden Metallverbindungen weitgehend Hydroxyde oder wenigstens basische Salze sind, während die Verbindungen mit Di-n-butylarsinsäure bereits eine normale Zusammensetzung aufweisen. Die geringen Säuregehalte der Kobalt- und Nickelverbindungen der Di-n-butylarsinsäure lassen es auch verständlich werden, daß einerseits praktisch überhaupt keine Extraktion der Nickelverbindung mit Di-n-butylarsinsäure erfolgt und auch das Kobalt nur zu 30%, und zwar erst im stark alkalischen Gebiet mit Chloroform extrahiert werden kann.

Über die Möglichkeit, Metallverbindungen der Di-n-butylarsinsäure mit organischen Lösungsmitteln aus wäßrigem Medium zu extrahieren, wird gesondert berichtet werden.

Zusammenfassung

Es wird berichtet, daß sich in geringem Umfang Metallverbindungen der aliphatischen Arsonsäuren, in weit größerem Umfang aber Metallverbindungen der aliphatischen Arsinsäuren aus wäßriger Lösung, in der diese Verbindungen entweder als Fällungen suspendiert oder gelöst enthalten sind, mit Benzol oder Chloroform extrahieren lassen.

Die Löslichkeit solcher Verbindungen in organischen Lösungsmitteln steht in engem Zusammenhang mit ihrer teilweise bereits früher mitgeteilten Zusammensetzung. Sie verstärkt die auf Grund des Maskierungseffektes aliphatischer Arsinsäuren geäußerte Vermutung, daß es sich bei diesen Verbindungen nicht um einfache, sondern um Innerkomplexsalze handelt.

Summary

A report is given regarding the extraction with chloroform or benzene of metal compounds of the aliphatic arsonic acids and also of the aliphatic

arsinic acids from aqueous systems in which these compounds are either dissolved or suspended. The compounds of the arsonic acids show this property to a far less extent than the compounds of the arsinic acids.

The solubility of such compounds in organic liquids is closely related to their composition, a matter which was discussed previously to some extent. This extractability confirms the surmise, based on the masking action of aliphatic arsinic acids, that these compounds are not simple salts but rather they are inner complex salts.

Résumé

On peut extraire par le benzène ou par le chloroforme les composés métalliques des acides arsoniques aliphatiques en faible quantité, et, en quantité beaucoup plus grande, les composés métalliques des acides aliphatiques arsiniques, à partir de la solution aqueuse dans laquelle ces composés se trouvent soit à l'état de suspension comme précipité, ou bien maintenus à l'état dissous.

La solubilité de ces composés dans les solvants organiques est en étroite liaison avec leur composition communiquée déjà en partie auparavant. Elle renforce l'hypothèse fondée sur l'effet de masquage des acides arsiniques aliphatiques, suivant laquelle il s'agit chez ces composés, non pas de sels complexes simples mais plutôt de complexes internes.

Literatur

[1] *R. Pietsch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1960**, 540.
[2] *R. Pietsch*, Mikrochim. Acta [Wien], **1962**, im Druck.
[3] *A. J. Quick* und *R. Adams*, J. Amer. Chem. Soc. **44**, 805 (1922).

Farbwerke Hoechst A. G., vormals Meister Lucius & Brüning,
Frankfurt/Main-Höchst

Neue Schnellmethode zur mikroanalytischen Bestimmung von Halogenen in organischen Substanzen. Die Bestimmung von Jod

Von

F. Ehrenberger

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 20. März 1961)

Zur Bestimmung von Halogenen in organischen Substanzen hat sich die Verbrennung in der Knallgasflamme als zuverlässiges Schnellaufschlußverfahren erwiesen. Die hohe Temperatur der Flamme gewährleistet den sicheren Aufschluß, und der in der Knallgasflamme entstehende Wasserdampf führt die Verbrennungsgase schnell und quantitativ in die Vorlage.

So hat sich die vor kurzer Zeit veröffentlichte Schnellmethode[1] zur mikroanalytischen Bestimmung von Chlor, Brom und Fluor in organischen Substanzen gut bewährt und konnte nun auch zur Bestimmung von Jod angewandt werden. Die Substanz wird dazu im Sauerstoffstrom verdampft bzw. zersetzt und in einer kleinen Knallgasflamme verbrannt. Das freigewordene Jod wird in einer Brom-Eisessig-Lösung absorbiert und darin zum Jodat oxydiert. Mit Hilfe der unten beschriebenen Quarzapparatur ist die serienweise Verbrennung einer beliebigen Anzahl Substanzeinwaagen ohne Abstellen der Knallgasflamme möglich. Eine Verbrennung dauert etwa 5 Minuten.

Apparatives

Die Apparatur* besteht aus der Schleuse, dem Verbrennungsrohr und der Vorlage, die mit einer Kühlvorrichtung versehen ist. Sie ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

---

* Hersteller der kompletten Apparatur: Heraeus Quarzschmelze G. m. b. H., Hanau/Main, Rohrstraße 8.

Reagenzien

Technisch reiner Wasserstoff und Sauerstoff (99,3 bis 99,5%);

Wäßrige Natriumacetatlösung: 40 g Natriumacetat ($+ 3\ H_2O$) p. a., in 200 ml Wasser gelöst;

Brom-Eisessiglösung: 10 g Natriumacetat ($+ 3\ H_2O$) in 100 g Eisessig p. a. gelöst + 2 ml Brom (jodfrei);

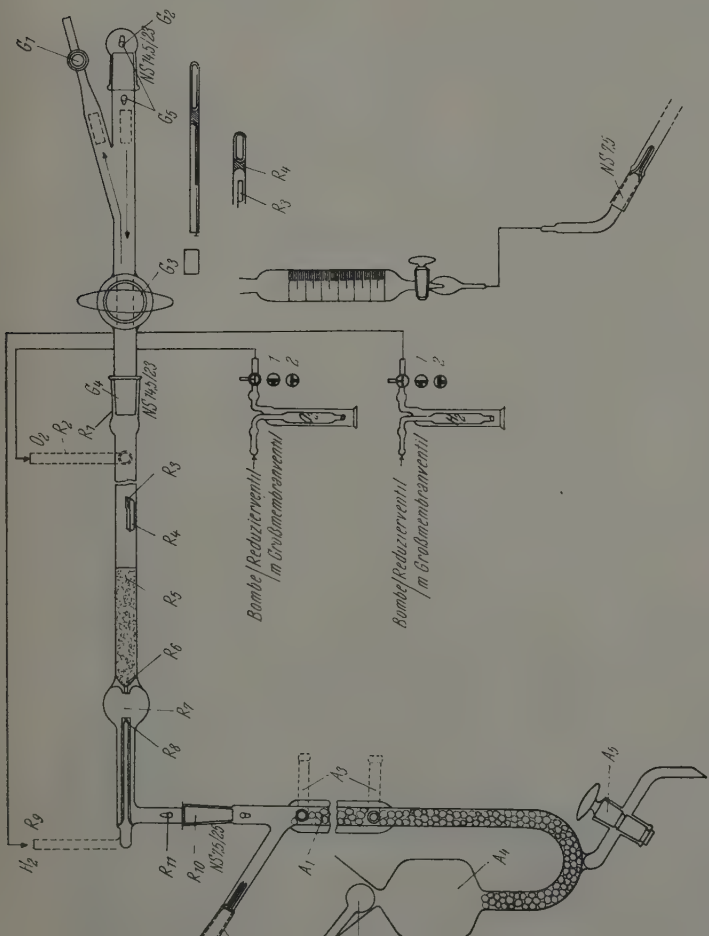


Abb. 1. Schleusengabel, bestehend aus: Entlüftungshahn (G_1), abnehmbarer Verschlußkappe (G_2), Schleusenhahn (G_3) mit 10,5-mm-Bohrung, Schliffkern (G_4) NS 14,5, Häkchen (G_5) für Federsicherung, Verbrennungsrohr, bestehend aus: Schliffhülse NS 14,5 (R_1) zum Anschließen der Schleusengabel (gedichtet mit Königschem Glaskitt), Sauerstoffzuführung (R_2), Schiffchen für Substanz (R_3), Körbchen aus Quarzglas (R_4) mit eingeschmolzenem Nickelkern zum Transport der Schiffchen oder Nickelboot, Rolle aus Platindrahtnetz (R_5) (150 × 50 mm mit einer Drahtstärke von 0,06 mm und 1024 Maschen/cm²), Kapillar-Brennerrohr (R_6) für Sauerstoff (innerer Durchmesser 3 mm), Verbrennungskammer (R_7), Kapillar-Brennerrohr (R_8) für Wasserstoff (innerer Durchmesser 2,5 mm), Wasserstoffzuführung (R_9), Schliff NS 7,5 (R_{10}) zum Anschließen der Absorptionsvorlage (mit einem Tropfen konz. H_3PO_4 oder H_2SO_4 gedichtet), Häkchen (R_{11}) für Federsicherung. Das Verbrennungsrohr wird von Zeit zu Zeit mit 5%iger Flußsäure gereinigt. Absorptionsvorlage, bestehend aus: Quarzkühler, mit Quarzperlen gefüllt (A_1),

Jodkalium (jodatfrei): 10%ige Lösung in Wasser;
Natriumthiosulfatlösung, 0,02-n;
Schwefelsäure, 2-n;
Kaliumpyrosulfat, p. a.

Ausführung der Bestimmung

a) Anstellen der Knallgasflamme (die Substanz wird im Sauerstoffstrom verdampft)

Die Gaswaschflaschen, die etwa zu einem Drittel mit 20%iger Natronlauge gefüllt sind, werden mittels Gummischlauches mit den Gasbomben bzw. mit der Apparatur (R_2 und R_9) verbunden. Der Dreiweghahn beider Waschflaschen ist in Stellung *1*, sie werden erst mit dem entsprechenden Gas gespült. Der Hahn der Sauerstoffwaschflasche wird nun in Stellung *2* gedreht – die Apparatur wird mit Sauerstoff durchgespült. Nun wird die kugelförmige Erweiterung des Verbrennungsrohres mit einer rauschenden Bunsenflamme angeheizt. Der Dreiweghahn der Wasserstoffwaschflasche ist noch in Stellung *1* und Wasserstoff strömt langsam durch (etwa 2 Blasen pro Sekunde). Nach 2 Minuten hat der Brenner genügend hohe Temperatur (etwa 800° C); nun wird der Hahn der Wasserstoffwaschflasche in Stellung *2* gebracht, der Wasserstoff strömt durch das Kapillarbrennerrohr R_8 in den Brenner und die Flamme entzündet sich fast lautlos. Durch weiteres Öffnen der Reduzierventile wird die Flamme so eingestellt, daß sie in der Mitte der Verbrennungskammer brennt und diese eben ausfüllt, den Quarz aber nicht zum Glühen bringt. Zum Abstellen der Flamme wird diese durch abwechselndes Drosseln der Reduzierventile kleingestellt und dann der Dreiweghahn der Wasserstoffwaschflasche in Stellung *1* gedreht, so daß der Wasserstoff nach außen entweichen kann.

b) Einwaage und Verbrennung der Substanz

Je nach Jodgehalt werden von festen Substanzen 4 bis 10 mg in ein Platinschiffchen oder in ein Quarzröhrchen mit eingeschmolzenem Nickelkern eingewogen und mit einem kleinen Quarzwollebausch abgedeckt. Wenn die Substanz anorganische Bestandteile enthält, wird eine Spatelspitze Kaliumpyrosulfat zugegeben, um eventuell anorganisch gebundenes Jod auszutreiben. Nach magnetischer Einschleusung der Substanz wird der Zulauf von Brom-Eisessig-Lösung angestellt (etwa 1 Tropfen pro Sekunde) und das Schiffchen mit der Substanz wird dann mit einem Bunsenbrenner erhitzt. Die Absorptionslösung (Brom-Eisessig) wird über das Zulaufröhrchen aus einem Tropftrichter zugegeben. Der Tropftrichter ist mittels Ventilschlauches mit dem Zulaufröhrchen verbunden.

Die Substanzdämpfe werden über dem glühenden Platinkontakt bereits weitgehend zersetzt, durch den Sauerstoffstrom in die Knallgasflamme geführt und dort verbrannt. Nach einer Gesamtverbrennungszeit von etwa 4 Minuten wird der Zulauf von Brom-Eisessig-Lösung gestoppt und der Abflußhahn A_5 geöffnet.

c) Titration

Die Vorlagelösung läßt man in einen 200-ml-Erlenmeyerkolben abfließen, der mit 5 ml wäßriger Natriumacetatlösung (s. oben) beschickt ist. Dann wird das Zulaufröhrchen von A_2 abgenommen und die Absorptionsvorlage abwechselnd über A_2 und A_6 mit dest. Wasser ausgespült. Die Bestimmung des Jods in der Vorlagelösung erfolgt nun nach *Leipert*[2] bzw. *Vieböck* und *Brecher*[3].

Nach dem Ausspülen der Absorptionsvorlage kann ohne Abstellen der Knallgasflamme sofort mit der Verbrennung der nächsten Probe begonnen werden. Dazu wird der Abflußhahn A_5 geschlossen, das Zulaufröhrchen auf den Ausspülstutzen A_2 aufgesetzt und nach Einschleusung eines neuen Substanzschiffchens der Zulauf von Brom-Eisessig-Lösung angestellt.

Tabelle 1

Substanz	mg	n	% J		d	s
			ber.	gef. (mittel)		
Trijodphenol	4—8	18	80,69	80,62	— 0,07	0,22
Jodoform	3—5	2	96,69	96,65	— 0,04	
β,β'-Dijoddiäthylsulfon	5—6	2	67,86	67,90	+ 0,04	
5-Chlor-2-jod-4-nitro-toluol.....	4—7	2	42,66	42,53	— 0,13	
2,2-Diphenyl-Trimethylammonium-jodid	6—9	2	34,56	34,67	+ 0,11	
4,4'-Methoxy-phenoxy-3-jod-zimtsäure	4—6	2	32,03	32,15	+ 0,12	
2-N-Propyl-3-imino-5,6-diphenyl-2,3-dihydro-1,2,4-triazinjodhydrat	4—5	2	30,34	30,27	— 0,07	
Kaliumjodid.....	8,935	1	76,44	76,26	— 0,18	mit $K_2S_2O_7$ als Zuschlag
	10,769	1	76,44	76,26	— 0,18	durch direkte Oxydation

n Anzahl der Verbrennungen;
d Abweichung des mittleren vom theoretischen Jodgehalt;
s Standardabweichung[4].

Flüssigkeiten werden, wie es für die Chlor-, Brom- und Fluorbestimmung beschrieben wurde, eingewogen und verbrannt. Da während der Verbrennung Bromdämpfe aus der Vorlage entweichen, ist es empfehlenswert, die Verbrennung unter einem Abzug durchzuführen.

Beleganalysen

Nach dieser Methode konnten auch Substanzen mit hohem Jodgehalt, wie z. B. Jodoform und Trijodphenol, genau analysiert werden (s. Tabelle 1 auf S. 593).

Zusammenfassung

Die Schnellmethode zur mikroanalytischen Bestimmung von Chlor, Brom und Fluor in organischen Substanzen wurde auch zur Jodbestimmung angewandt. Dazu wird die Substanz im Sauerstoffstrom verdampft und in einer kleinen Knallgasflamme verbrannt. Das freiwerdende Jod wird mit dem in der Knallgasflamme entstehenden Wasserdampf schnell und quantitativ in die Vorlage gespült, wo es in Brom-Eisessig-Lösung absorbiert und zu Jodat oxydiert wird. Das Jod wird anschließend nach *Leipert* bestimmt.

Summary

The rapid method for the microanalytical determination of chlorine, bromine, and fluorine in organic materials has been applied also for iodine. The material is vaporized in a stream of oxygen and burned in a small oxyhydrogen flame. The liberated iodine is swept by the water vapor formed in the flame into a receiver, where it is absorbed in bromine-acetic acid solution and oxidized to iodate. The iodine is subsequently determined after *Leipert*.

Résumé

On a appliqué au dosage de l'iode, la nouvelle méthode de dosage microanalytique du chlore, du brome et du fluor dans les substances organiques. Pour cela, on vaporise la substance dans un courant d'oxygène et l'on effectue la combustion dans une petite flamme oxhydrique. L'iode libéré, entraînant la vapeur d'eau formée dans la flamme oxhydrique, est lavé rapidement et quantitativement dans l'allonge, où on l'absorbe par une solution de brome dans l'acide acétique cristallisable et où on l'oxyde en iodate. Pour finir, on dose l'iode suivant *Leipert*.

Literatur

[1] *F. Ehrenberger*, Mikrochim. Acta [Wien] **1959**, 192.
[2] *Th. Leipert*, Mikrochem. Pregl-Festschrift 266 (1929).
[3] *F. Vieböck* und *C. Brecher*, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 3207 (1930).
[4] Vgl. *H. Kaiser* und *H. Specker*, Z. analyt. Chem. **149**, 46 (1956).

Laboratorio da Produção Mineral, Ministério das Minas e Energia
Rio de Janeiro, Brasil

Nachweis von Arylsulfinsäuren in der Tüpfelanalyse

Von

F. Feigl, D. Haguenauer-Castro und **E. Libergott**

(Eingegangen am 10. April 1961)

In der qualitativen organischen Analyse waren für Sulfinsäuren lange keine befriedigenden Nachweise bekannt. Erst vor kurzem ist hierfür ein in der Arbeitsweise der Tüpfelanalyse ausführbares Verfahren beschrieben worden[1]. Es beruht darauf, daß in saurer Lösung bei Einwirkung von Raney-Legierung (50% Al, 50% Ni) durch intermediäre Bildung von Raney-Nickel reduktive Abspaltung von Schwefelwasserstoff erfolgt; durch die Schwärzung von Bleiacetatpapier werden Erfassungsgrenzen von 1 bis 5 μg der betreffenden Sulfinsäuren erreicht. Bei Anwendung des Verfahrens ist zu beachten, daß Thioketone, Thiolverbindungen, Sulfide und Disulfide bei Behandlung mit Raney-Legierung und Säure gleichfalls Schwefelwasserstoff abspalten. Es ist deshalb die vorherige Prüfung auf die genannten Verbindungen und gegebenenfalls, soweit dies möglich, die Abtrennung von Sulfinsäuren durch Bildung ihrer wasserlöslichen Alkalisalze erforderlich.

Mit Rücksicht auf die unzureichende Spezifität und den Vorteil der Verwendung von Nachweisen mit verschiedenen Empfindlichkeiten, erschien es wünschenswert, nach charakteristischen, analytisch verwertbaren Umsetzungen von Sulfinsäuren zu suchen. Es wurden in der chemischen Literatur zwei Angaben gefunden, deren Berücksichtigung zu spezifischen Nachweisen von Arylsulfinsäuren führte.

Nachweis durch Umsetzung mit Quecksilberchlorid

Von *Peters*[2] ist festgestellt worden, daß bei Einwirkung von Quecksilberchlorid auf Phenylsulfinsäuren bzw. deren Salze unter Abspaltung von Schwefeldioxyd Phenylquecksilberchlorid entsteht:

$$C_6H_5SO_2H(Na) + HgCl_2 \rightarrow C_6H_5HgCl + H(Na)Cl + SO_2.$$

Nach unseren Versuchen zeigen andere Aryl- und kernsubstituierte Arylsulfinsäuren das gleiche Verhalten. Die Umsetzungen erfolgen sehr schnell in alkoholisch-wäßriger Lösung; ihr Eintritt, und damit das Vorliegen von Sulfinsäuren kann durch den Nachweis des abgespaltenen Schwefeldioxyds leicht erkannt werden. Hierzu ist die Blaufärbung von mit Wasserstoffperoxyd befeuchtetem Kongopapier empfehlenswert; es können auch andere in der Tüpfelanalyse verwendete Farbreaktionen der schwefligen Säure[3] herangezogen werden.

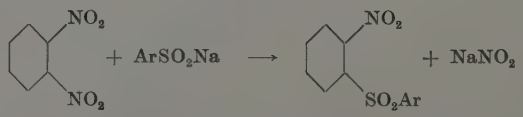
Arbeitsweise: In eine Mikroeprouvette wird eine kleine Menge der festen Probe gebracht oder ein Tropfen der wäßrigen Probelösung zur Trockene verdampft. Nach Zusatz einiger Milligramm Quecksilberchlorid und eines Tropfens Alkohol wird die Mikroeprouvette in ein auf 80° erwärmtes Wasserbad getaucht und auf ihr offenes Ende ein Scheibchen mit 5%igem Wasserstoffperoxyd befeuchtetes Kongopapier gelegt. Nach Verdampfen des Alkohols wird die Temperatur auf 100° gesteigert. Der positive Ausfall des Nachweises ist an der Bildung eines blauen Fleckes auf dem roten Indikatorpapier zu erkennen.

Es waren nachweisbar:

0,25 μg Benzolsulfinsaures Natrium,
0,3 μg Naphthalinsulfinsäure,
2,5 μg Toluolsulfinsäure,
50 μg 3-Acetamino-4-methoxy-benzolsulfinsäure.

Nachweis durch Umsetzung mit o-Dinitrobenzol

Ein von *Landers*[4] beschriebenes Verfahren zur Herstellung von Nitroarylsulfonen beruht auf der Umsetzung von Alkaliarylsulfinaten mit o-Dinitrobenzol



Der Ablauf obiger Reaktion und damit das Vorliegen von Arylsulfinaten ist daran zu erkennen, daß das Reaktionsgemisch einen positiven Ausfall der bekannten Grießschen Reaktion auf salpetrige Säure zeigt. Die Nitritbildung erfolgt am schnellsten bei Verwendung von Glycerin als Lösungsmittel und Erwärmung auf 120°. p-Dinitrobenzol verhält sich wie das o-Dinitrobenzol. m-Dinitrobenzol zeigt eine sehr schwache Reaktion, was wahrscheinlich auf Verunreinigungen des von uns verwendeten Präparates durch das o-Isomere zurückzuführen ist.

Arbeitsweise: In einer Mikroeprouvette wird 1 Tropfen der Probelösung (enthaltend Alkali- oder Erdalkalisalze der Sulfinsäure) zur Trockene verdampft, und nach Zusatz einiger Milligramm o-Nitrobenzol und 1 Tropfen Glycerin im Glycerinbad 5 Minuten bei 120° belassen. Nach Abkühlung werden 2 Tropfen Grieß-Reagens zugesetzt und schwach erwärmt (Wasserbad). Der positive Ausfall der Reaktion ist durch eine Rot- oder Rosafärbung zu erkennen. Es ist empfehlenswert, mit einigen Tropfen Chloroform auszuschütteln, um unverbrauchtes o-Dinitrobenzol zu entfernen.

Reagenzien: 1. 1%ige Lösung von Sulfanilsäure in 30%iger Essigsäure; 2. 0,1%ige Lösung von α-Naphthylamin in 30%iger Essigsäure. Gleiche Teile von 1. und 2. vor Gebrauch vereinigen.

Es waren nachweisbar:

10 μg Benzolsulfinsaures Natrium,
12 μg Naphthalinsulfinsäure,
5 μg Toluolsulfinsäure,
20 μg 3-Acetamino-4-methoxy-benzolsulfinsäure.

Im Falle des Vorliegens freier Säuren ist deren Überführung in Kalksalze, die sich ebenso wie Alkalisalze verhalten, erforderlich. Dies kann in der Weise geschehen, daß man die wäßrige Probelösung mit überschüssigem Calciumcarbonat erwärmt, filtriert und 1 Tropfen des Filtrates prüft. Man kann auch so vorgehen, daß man in einer Mikroeprouvette zu 1 Tropfen der wäßrigen Probelösung eine minimale Menge Calciumcarbonat zusetzt, eindampft und weiter wie oben beschrieben verfährt. Die Anstellung einer Vergleichsprobe mit o-Dinitrobenzol ohne Sulfinat ist empfehlenswert, weil o-Dinitrobenzol spurenweise unter Bildung von Nitrit denitrosiert wird.

Zusammenfassung

Zum selektiven Nachweis von Arylsulfinsäuren eignet sich die Abspaltung von Schwefeldioxyd bei der Einwirkung von Quecksilber(II)-chlorid sowie die Umsetzung mit o-Dinitrobenzol, wobei salpetrige Säure gebildet wird. Beide Reaktionsprodukte sind mit Hilfe von Tüpfelreaktionen feststellbar. Es werden mikroanalytische Erfassungsgrenzen erreicht.

Summary

The arylsulfinic acids can be selectively detected through the splitting out of sulfur dioxide under the action of mercury(II) chloride, and also through reaction with *o*-dinitrobenzene, which results in the formation of nitrous acid. Both of these reaction products can be detected by spot reactions.

Résumé

Pour rechercher sélectivement les acides arylsulfiniques, on utilise la séparation de l'anhydride sulfureux par action du chlorure de mercure-II ainsi que la transformation par l'*o*-dinitrobenzène, ce qui engendre de l'acide nitrique. On caractérise les deux produits de réaction par analyse à la touche.

Literatur

[1] *F. Feigl*, Analyt. Chemistry **33**, im Druck.
[2] *K. Peters*, Ber. dtsch. chem. Ges. **38**, 2570 (1905).
[3] *F. Feigl*, Tüpfelanalyse. Frankfurt/Main: Akademische Verlagsgesellschaft. 1960. Bd. I, S. 310ff.
[4] *H. Landers*, U. S. Pat. 1936721; Chem. Abstr. **28**, 1049 (1934).

Aus dem Analytischen Institut der Universität Wien

Spektrophotometrische Bestimmung von Vanadium mit Solochrome Black RN

Von

G. E. Janauer, F. Tera und **J. Korkisch**

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 6. April 1961)

1. Einleitung

Die hier beschriebenen spektrophotometrischen Untersuchungen wurden mit dem Ziel begonnen, eine einfache und empfindliche Methode zur direkten Bestimmung von Mikrogrammengen Vanadium in stark salzsauren, methanolischen Medien, wie sie z. B. bei der Bestimmung von Verteilungskoeffizienten[1] und bei den häufig in diesem Laboratorium auszuführenden Ionenaustauschtrennungen anfallen[2,3], zu entwickeln, wodurch zeitraubende Operationen, wie Eindampfen, Wiederauflösen und quantitatives Transferieren, vermieden werden. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe von Azofarbstoffen auf ihre Eignung als Reagenzien zur photometrischen Bestimmung von Vanadium untersucht. Von diesen zeigte sich Solochrome Black RN als für unsere Zwecke sehr geeignet, während sich mit Solochrome Dark Blue und Solochrome Black AS Vanadium-Farbstoffkomplexe wesentlich geringerer Extinktion ausbildeten. Diese drei Farbstoffe wurden schon früher zur spektrophotometrischen Bestimmung von Molybdän verwendet[4]. Solochrome Dark Blue ermöglicht auch eine sehr empfindliche Bestimmung von Titan unter ähnlichen Bedingungen[5]. In allen diesen Fällen ist Methanol das beste Lösungsmittel, einerseits wegen der besseren Löslichkeit der Farbstoffe, anderseits wegen einer erheblichen Extinktionssteigerung gegenüber anderen Lösungsmitteln, wie z. B. Wasser, Äthanol, Isopropanol, Dioxan usw.

Obwohl die hier angegebene Methode die Empfindlichkeit der Vanadiumbestimmung mit Solochrome Fast Grey[6] nicht übersteigt, bietet sie gegenüber dieser gewisse Vorteile. Die Messungen können bei zehnfacher Acidität ohne vorangehendes Erhitzen der Meßlösungen in

methanolischem Medium ausgeführt werden. Ein Teil der diese Methode störenden Fremdionen läßt sich durch Zugabe von ÄDTA maskieren, wie z. B. Zirkonium, Thorium usw. Auch Cu(II) und Fe(III) stören die Bestimmung bis zu 50 μg/10 ml Meßlösung nicht. Fast alle anderen störenden Ionen können durch Ionenaustausch von Vanadium getrennt werden[2,3].

Der violettgefärbte Komplex des Vanadiums mit Solochrome Black RN zeigt bei einer Wellenlänge von 560 nm maximale Extinktion und eine Empfindlichkeit von 0,05 ppm (nach *Sandell*[7]). Im Vergleich dazu weisen die beiden anderen untersuchten Farbstoffe Empfindlichkeiten von nur 0,075 (Solochrome Dark Blue) bzw. 0,15 ppm (Solochrome Black AS) auf.

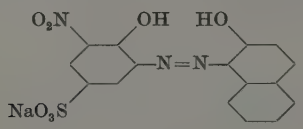
2. Lösungen, Reagenzien und Apparatur

Vanadiumstandardlösungen

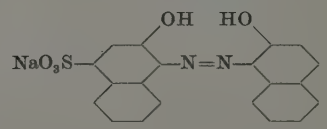
Durch Verdünnen einer 1-n salzsauren Vanadiumstammlösung von 1 mg Vanadium/ml mit 1-n Salzsäure wurden Vanadiumstandardlösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt. Dies sowie die Überprüfung des Gehaltes der obigen Stammlösung wurde so wie früher beschrieben ausgeführt[3,7,8].

Farbstofflösungen

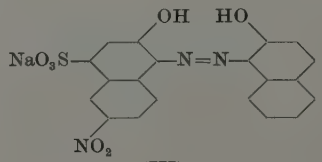
Durch Auflösen von je 100 mg der Azofarbstoffe Solochrome Black RN (I) (C. I. Mordant Black 15), Solochrome Dark Blue B (II) (C. I. Mordant Black 17) und Solochrome Black AS (III) (C. I. Mordant Black 1), die uns von der Firma Imperial Chemical Industries Ltd., Hexagon House, Blackley, Manchester, England, in freundlicher Weise überlassen wurden, in je 100 ml Methanol wurden 0,1%ige Lösungen bereitet. Diese wurden unter gelegentlichem Umschütteln 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend filtriert. Die filtrierten Lösungen wurden dann für die spektrophotometrischen Untersuchungen eingesetzt.



(I)



(II)



(III)

Lösungen von Fremdionen: Lösungen bekannten Gehaltes der Kationen Al, Mg, Ca, Sr, Ba, Fe(III), Ni, Co, Sn(II), Cr(III), Mn(II), Zn, Cd, UO_2(II), Ti, Zr, Hf, Th, Pb, Bi, Cu(II) und Mo(VI) in 1-n Salzsäure wurden aus p. a.-Reagenzien bereitet. Von den untersuchten Anionen Cl^-, SO_4^{2-}, NO_3^-, F^- und PO_4^{3-} lagen alle bis auf F^- und NO_3^- als Natriumsalze vor.

Ferner wurden angewendet: Methanol (chemisch rein), 1-n Salzsäure und eine 0,1-m ÄDTA-Lösung.

Apparatur: Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer, Modell B, unter Verwendung von 1-cm-Zellen und einer blauempfindlichen Photozelle ausgeführt.

3. Spektrophotometrische Bestimmung des Vanadiums

Auswahl der geeigneten Wellenlänge

1 ml einer 1-n salzsauren Vanadiumstandardlösung, die 25 μg Vanadium/ml enthielt, wurde in einem 10-ml-Meßkolben mit 1 ml Wasser und 3 ml der jeweiligen 0,1%igen Farbstofflösung versetzt, worauf mit

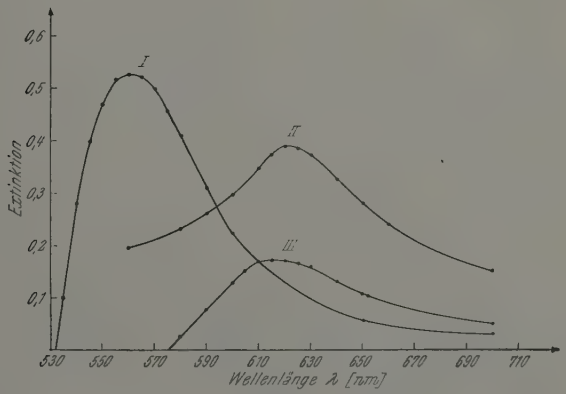


Abb. 1

Methanol zur Marke aufgefüllt wurde. Die Extinktionen dieser Lösungen wurden 1 Stunde später gegenüber analog bereiteten Reagensblindlösungen im Wellenlängenbereich zwischen 530 und 700 nm gemessen. Die Resultate dieser Messungen sind in Abb. 1 wiedergegeben. Wie daraus ersichtlich ist, liegen die Extinktionsmaxima der Vanadiumfarbstoffkomplexe bei 560 nm (Solochrome Black RN), 620 nm (Solochrome Dark Blue) und 610 bis 620 nm (Solochrome Black AS).

Einfluß der Acidität

Je 1 ml einer 1,0-n salzsauren Vanadiumstandardlösung von 25 μg Vanadium/ml wurde mit je 1 ml 1-, 2-, 3- bis 12-n Salzsäure versetzt. Nach Zusatz von 3 ml Farbstofflösung (RN) wurde mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 560 nm gegenüber einer analog hergestellten Reagensblindlösung gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Extinktion mit zunehmender Acidität langsam abfällt. Um die Extinktions-Aciditäts-Kurve auch für sehr geringe Säurekonzentrationen zu erhalten, wurden Messungen mit Vanadiumstandardlösungen geringerer Acidität (bis 0,01-n HCl) unter Zusatz von 1 ml Wasser, Farbstofflösung und dem auf 10 ml fehlenden Rest an Methanol durchgeführt. Da hier nur ein schwacher Anstieg der Extinktion mit abnehmender Säurestärke beobachtet wurde, wurden alle weiteren Versuche mit einer Säurekonzentration von 1 ml 1-n Salzsäure/10 ml Meßlösung (Gesamtnormalität 0,1-n) ausgeführt. Diese und alle weiter beschriebenen Experimente wurden nur mit dem Azofarbstoff Solochrome Black RN durchgeführt, da dieser die höchste Empfindlichkeit ergibt.

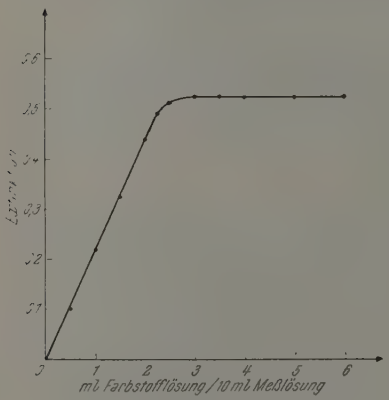


Abb. 2

Einfluß der Farbstoffkonzentration

Durch Versetzen von je 1 ml 1-n salzsaurer Vanadiumlösung, die 25 μg Vanadium/ml enthielt, mit 1 ml Wasser und 0,1 bis 6,0 ml Farbstofflösung wurden Lösungen verschiedener Farbstoffgehalte hergestellt. Diese wurden mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt und bei 560 nm gegen die entsprechenden Reagensblindlösungen photometriert. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist die Extinktion bei Gehalten von 3 ml und mehr Farbstofflösung keine Funktion der Farbstoffkonzentration. In allen weiteren Versuchen wurden 5 ml Farbstofflösung/10 ml eingesetzt.

Einfluß von Zeit, Temperatur und Reihenfolge der Reagenzienzugabe

Die Reihenfolge der Reagenzienzugabe sowie Änderung der Temperatur zwischen 15 und 30° C beeinflussen die Meßergebnisse nicht. Die Extinktion ist nur insofern zeitabhängig, als sie während einer

Stunde nach Bereiten der Meßlösung einem Maximalwert zustrebt, der jedoch innerhalb der folgenden 12 Stunden konstant bleibt.

Einfluß von Fremdionen

Die Vanadiumbestimmung wird durch folgende Fremdionen nicht gestört: Al, Mg, Ca, Sr, Ba, Sn(II), Pb, Cd, Zn, Cr(III), Bi, Mn(II), U(VI), Cl^-, SO_4^{2-}, NO_3^- und ÄDTA.

Geringfügige Störungen werden hervorgerufen durch Ni, Co und Fe(III). Sehr stark stören die Fremdionen: Cu(II), Ti, Zr, Hf, Mo(VI), U(IV) sowie Phosphat- und Fluoridionen.

Die verschiedenen Ionen wurden in fünf- bis zehnfachem Überschuß, die Anionen sogar in 100fachem Überschuß (als Alkalisalze) angewendet. Durch Zugabe von 0,1 ml ÄDTA-Lösung werden einige störende Elemente, wie z. B. Th, maskiert. Bei Eisen(III)- und Kupfer(II)-mengen über 50 μg kann die Störwirkung durch Zusatz einer Spatelspitze festen Kaliumjodids bequem ausgeschaltet werden. Die meisten störenden Elemente, die nicht maskierbar sind, können auf geeignete Weise mit früher beschriebenen Ionenaustauschmethoden vom Vanadium abgetrennt werden.

Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes

Die Lösungen enthielten: 0 bis 35 μg Vanadium gelöst in jeweils 1 ml 1-n Salzsäure, 1 ml Wasser, 0,1 ml ÄDTA-Lösung, 5 ml Farbstofflösung sowie dem auf 10 ml fehlenden Rest an Methanol. Diese Lösungen wurden gegen eine Reagensblindlösung bei 560 nm gemessen. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, gilt das Beersche Gesetz im Konzentrationsbereich von 0 bis 25 μg Vanadium/10 ml Meßlösung streng.

Empfindlichkeit und Genauigkeit

Die Empfindlichkeit der Methode beträgt nach *Sandell*[7] 0,05 ppm. Der mittlere Fehler (die Standardabweichung[9]) der Einzelmessung wurde (für $n = 6$ Messungen) mit 0,002 berechnet, und zwar ist dieser im Konzentrationsbereich von 5 bis 25 μg Vanadium praktisch konstant, während er bei kleineren Vanadiumkonzentrationen etwas zunimmt.

Arbeitsvorschrift

2 bis 4 ml der vanadiumhaltigen Lösung, die 0 bis 25 μg Vanadium, eine Menge an Salzsäure, die 1 ml 1-n Salzsäure entspricht, und insgesamt 2 ml wäßrige Phase (Rest Methanol) enthalten muß, werden in einen 10-ml-Meßkolben gebracht. Nach Zusatz von 0,1 ml ÄDTA-Lösung und 5 ml Farbstofflösung wird mit Methanol zur Marke aufgefüllt und die Extinktion bei 560 nm gegenüber einer Reagensblindlösung gemessen.

Mit Hilfe der Eichkurve (Abb. 3) läßt sich der Vanadiumgehalt der Probelösung sofort bestimmen.

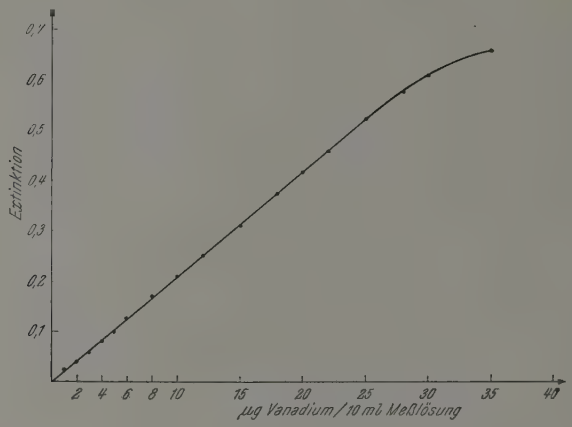


Abb. 3

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine sehr empfindliche und genaue spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Mikrogrammengen Vanadium in salzsauer-methanolischem Medium beschrieben. Als photometrisches Reagens dient der Azofarbstoff Solochrome Black RN, der mit Vanadium einen violettgefärbten Komplex bildet, der bei 560 nm maximale Extinktion zeigt. Mittels dieser Methode lassen sich noch 0,05 ppm Vanadium bestimmen. Das Beersche Gesetz gilt im Konzentrationsbereich von 0 bis 25 µg Vanadium/10 ml Meßlösung.

Summary

The present study deals with a very sensitive and precise spectrophotometric method for determining microgram quantities of vanadium in hydrochloric acid-methanol medium. The photometric reagent is the azo dyestuff Solochrome Black RN, which forms a violet complex with vanadium, which shows maximal extinction at 560 nm. As little as 0.05 ppm vanadium can be determined by this method. Beer's law holds within the concentration range from 0 to 25 µg vanadium/10 ml of test solution.

Résumé

On décrit dans ce travail une méthode spectrophotométrique exacte et très sensible pour doser en milieu méthanol-acide chlorhydrique des quantités de l'ordre du microgramme de vanadium. On utilise comme réactif

photométrique le colorant azoïque noir solochrome RN, qui donne avec le vanadium un complexe violet présentant un maximum d'absorption à 560 nm. Cette méthode permet de doser jusqu'à 0,05 ppm de vanadium. La loi de Beer est suivie dans le domaine des concentrations de 0 à 25 μg de vanadium pour 10 ml de solution à doser.

[Literatur

[1] *G. E. Janauer* und *J. Korkisch*, Talanta, im Druck.
[2] *G. E. Janauer* und *J. Korkisch*, Z. analyt. Chem. **179**, 241 (1961).
[3] *J. Korkisch* und *A. Farag*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 646.
[4] *J. Korkisch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1961**, 564.
[5] *J. Korkisch*, Mikrochim. Acta [Wien] im Druck.
[6] *H. Khalifa* und *A. Farag*, Z. analyt. Chem. **158**, 109 (1957).
[7] *E. B. Sandell*, Colorimetric Determination of Traces of Metals. 2. Aufl. New York: Interscience Publishers. 1950.
[8] *F. D. Snell* und *C. T. Snell*, Colorimetric Methods of Analysis, 3. Aufl. New York: Van Nostrand. 1949. S. 453.
[9] Guide for Measures of Precision and Accuracy, Analyt. Chemistry **33**, 480 (1961).

National Chemical Laboratory, Poona, India
Communication No. 441

Direct Micro Determination of Oxygen in Organic Compounds

By

V. S. Pansare and V. N. Mulay

With 2 Figures

(Received January 18, 1961)

The semimicro method of *Schütze*[1] for the determination of oxygen has been elegantly transposed to the micro scale by *Zimmermann*[2] and *Unterzaucher*[3] with such changes as would be necessary for such adaptation. *Zimmermann*[2] pyrolysed the compound in a current of nitrogen and led the products of pyrolysis over carbon maintained at 1000° C to convert them into carbon monoxide. The oxidation of carbon monoxide to carbon dioxide was then brought about by reacting it with iodine pentoxide, and the carbon dioxide formed was weighed. *Unterzaucher*[3] titrated the iodine liberated from iodine pentoxide. To overcome the difficulties encountered in the procedure of *Zimmermann*, he introduced certain additional changes. The striking features of his method are successful elimination of the blank and the necessary elevation of the temperature of the thermal decomposition furnace to 1120° C for complete conversion of carbon dioxide and moisture formed during pyrolysis to carbon monoxide. A better accuracy is claimed.

The method of *Unterzaucher* has been critically examined and modified by many workers[4–12]. Although complete elimination of the blank has been somewhat controversial[3,15–18], the reported values of the blank are fairly low. The interference of hydrogen, hydrogen sulphide, carbon disulphide, carbonyl sulphide has been experienced by several workers, and many modifications have been suggested to avoid it[7,8,19]. *Körbl*[20], *Kirsten*[12], *Ogg*[21] and *Ma*[22] have summarized various difficulties encountered in the Unterzaucher procedure and the means adopted to overcome them. The use of the high temperature furnace and of reagents of high purity, requiring special treatment, made further investigations necessary.

Schöniger[13] has reported low values resulting from the graphitization of carbon and serious changes in the blank due to the devitrification at 1120° C of the thermal decomposition tube.

Oita and *Conway*[23] have used a combustion tube filling consisting of platinum and platinized carbon maintained at 900° C for successful conversion of the products of pyrolysis to carbon monoxide. This method was examined by *Oliver*[24] who placed a copper gauze into the combustion tube to remove the interfering sulfur compounds.

The use of a low temperature furnace would increase the life of the combustion tube considerably. However, it also involves preparation and treatment of special reagents. The obvious advantages of low temperature led us to develop the method described here. Analytical results for some of the compounds analyzed in this laboratory with this method are given in Table I. They indicate that the maximum error of the method is $\pm 0.3\%$ oxygen. The present investigation is restricted to the compounds containing the elements carbon, hydrogen, and oxygen; combinations of these three elements represent a very big class of the naturally occurring organic compounds for which oxygen determination is usually needed. Further investigations to adapt the method for compounds containing nitrogen, sulfur, and halogens as additional elements are in progress.

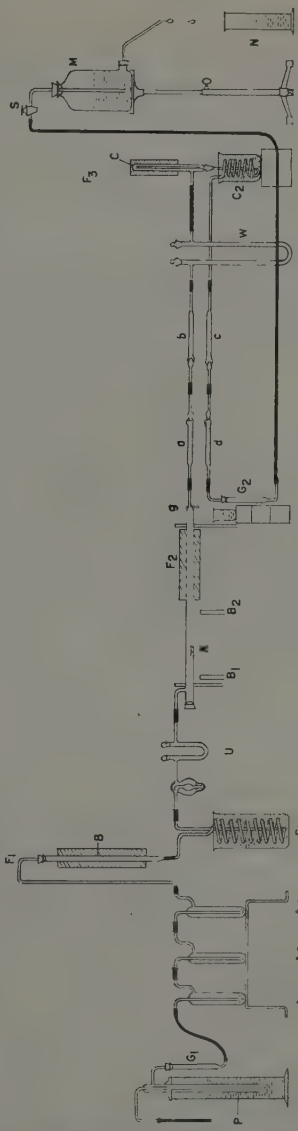


Fig. 1. Combustion Train

Fig. 1 shows the apparatus. The furnaces F_2, F_3, the combustion tube A and the absorption tubes a, b, c, d, are those supplied by Arthur H. Thomas Co., U. S. A., for the micro carbon and hydrogen train.

The preheater type furnace of the carbon and hydrogen set is used as the carbon monoxide converter F_3, which contains copper oxide heated to 300° C.[10,11] The U-tube *W* is filled with treated paraffin wax to trap the hydrocarbons, mainly liquids, formed during pyrolysis. The capillary of a broken absorption tube is attached to the end of this U-tube so that it faces the first set of absorption tubes. A similar capillary is attached also to the outlet of the carbon monoxide converter. Thus the possibility of air rushing into the converter while removing the absorption tubes is reduced to a minimum. Two sets of absorption tubes are filled with Dehydrite and Ascarite as in the carbon and hydrogen estimation. Of the absorption tubes which are joined head to head, *a* and *b* absorb moisture and carbondioxide, respectively, from the pyrolysis products, whereas *c* and *d* absorb moisture and carbon dioxide formed by the oxidation of the pyrolytic hydrogen and carbon monoxide, respectively.

Reagents

Nitrogen gas of high purity, 99%;
Platinized asbestos, 30% Pt, British Drug House;
Platinum-rhodium gauze, 10% Rh;
Platinum tetrahedra as used by *Pregl*;
Silver wool, micro analytical reagent of the British Drug House; and
Treated paraffin wax.

The platinized asbestos, the platinum-rhodium gauze, and the platinum tetrahedra are heated in a muffle furnace for one hour at 700° C.

Molten paraffin wax is stirred for about 15 minutes at a temperature slightly above its melting point. After the volatile matter has been driven off, the wax is cooled and cut into small cubes of approximately two cubic millimeters.

Filling of the Thermal Decomposition Tube

As shown in Fig. 2, silver wool rolls[25] are first introduced in the tube to spread over a length of 80 mm of which 15 mm are covered by the furnace. The packing of these rolls is kept loose towards the capillary

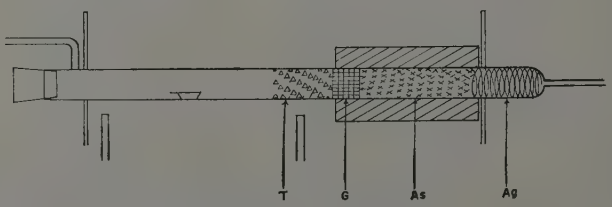


Fig. 2. Thermal Decomposition Tube

end of the combustion tube to avoid undesirable conduction of heat from the furnace to the capillary, thus rendering the condensation of solid hydrocarbons more effective. This can be checked by carrying out blank determinations where the moisture formed would be usually between 5 to 10 micrograms only. If the weight of the first absorption tube shows an increase exceeding 10 micrograms consistently during the blank determinations, the tube filling should be repeated until the requirements are satisfied.

The silver wool is followed by a 150-mm layer of platinized asbestos. A roll of platinum-rhodium gauze, 40 mm long, is then introduced so that 30 mm of its length is covered by the furnace. At the end, platinum tetrahedra are added to bring length of the tube filling to 340 mm.

Conditioning of the Tube Filling

After displacing the air from the train by purified nitrogen, the furnaces are switched on. When they have attained the required temperatures (pyrolysis furnace, 700° C and the carbon monoxide converter, 300° C) and the adsorbed air has been swept out, the conditioning of the tube filling is carried out by burning two samples of phenanthrene, each having a weight between 5 and 10 mg. If the train has not been used for some time, it is necessary to continue the sweeping with nitrogen for at least 24 hours before starting with the conditioning. In routine work the furnace may be switched off at the end of a working period but a slow current of 5 ml purified nitrogen per minute is always maintained.

Performance of Oxygen Determination

Depending upon the oxygen content, from 3 to 7 mg of the sample is weighed into a platinum boat. Although the train has been found to give satisfactory results with amounts of sample giving from 0.5 to 2 mg oxygen, sample sizes corresponding to 1.0 to 1.5 mg oxygen are recommended to keep within safe limits.

Two thick-walled capillaries with an outer diameter equal to that of the connecting tubes and long enough to take the space of a pair of absorption tubes are substituted for the absorption tubes in the train. The stopcock *S* of aspirator *M* is closed to test for the absence of leakage. After increasing the rate of the gas flow, the stopper of the combustion tube is briefly opened and the boat with the sample is quickly introduced and moved within 4 or 5 cm of the platinum tetrahedra. For an alternate procedure, which is preferable with volatile liquids, the boat with the capillary containing the sample is introduced into the combustion tube and a small piece of iron wire (sealed into glass) is placed behind it. For starting pyrolysis, the boat is later moved to the desired position with the aid of a magnet.

The insertion of the boat is very conveniently done in about 15 seconds. The time actually required is measured with a stop watch and recorded. It is necessary to maintain a flow of gas, which prevents the rising of the hydroxide solution in the inner tube *p* of the pressure regulator and assures a stream of nitrogen from the opening of the combustion tube, which prevents air from entering. The time needed for introducing the sample and the velocity of the outflow of gas must be watched for obtaining closely reproducible blank which contributes largely to the accuracy of the determinations.

Any air which may have entered is swept out by passing through the train 150 ml of carrier gas at a rate of 8 to 10 ml per minute. The current of gas is then stopped by closing the stopcock of the aspirator. The capillaries are removed and replaced by the weighed absorption tubes after a disk of asbestos, 15 mm in diameter and 3 mm thick, has been slid over the capillary outlet of the combustion tube as shown in Fig. 1 at *g*. Finally a strip of cotton pad or lint, 2 mm thick, is wound around the part of the combustion tube between the furnace and *g* to hold it at room temperature by keeping the pad moist throughout the determination. This is done by immersing the two ends of the strip in a beaker with water. The capillary tip of the combustion tube is left uncovered.

To start the combustion, the stopcock is opened and the flow of nitrogen adjusted to 4 or 5 ml per minute. The movable burner B_1 and the stationary burner B_2 below the platinum tetrahedra are lighted simultaneously. Burner B_1 is moved slowly toward the sample, brought below it within the first 5 minutes, kept there for the next 5 minutes, and moved up to burner B_2 within the following 5 minutes. To ensure pyrolysis of the traces of sample which might have escaped upstream because of the slight pressure developing in the combustion tube, the movable burner is returned to position B_1 and moved to B_2 within 5 minutes. Burner B_1 is then turned off and the sweeping of the pyrolysis products continued until 200 ml of water[14] have been collected from the aspirator. Then burner B_2 is turned off and the aspirator stopcock is closed to stop the flow of gas. The absorption tubes are removed from the train and *a*, *b*, and *d* are weighed after displacing the nitrogen by air free from carbon dioxide and moisture as in the determination of carbon and hydrogen. For a continuous sequence of determinations this may be avoided by displacing the air from the absorption tubes with nitrogen before taking the initial weights.

The moist lint is removed from the combustion tube and, after wiping it dry, this part of the tube is slowly heated with a burner to expel the deposit of solid hydrocarbon. The capillaries are then attached, the sample for the second combustion is introduced, and the sweeping is started. The absorption tubes may be weighed while the sweeping proceeds.

For the determination of the blank, from 4 to 7 mg of phenanthrene are burned as described above.

Computation of the Weight of Oxygen

Since water, carbon dioxide, and carbon monoxide do not always form in the same proportion, it is preferable to deduct the blank in terms of weight of oxygen from the total weight of oxygen found in the determinations.

If A_0, B_0, C_0 and A, B, C stand for the weight increases of absorption tubes a, b and d in the blank combustion and in the determination, it follows that:

$$\text{Weight of Oxygen} = 0.8882\,A + 0.7273\,B + 0.3636\,C - \text{Blank},$$
$$\text{Blank} = 0.8882\,A_0 + 0.7273\,B_0 + 0.3636\,C_0.$$

Results

The largest error observed was $\pm 0.3\%$ oxygen. The accuracy possibly may be improved further by using nitrogen of higher purity which would minimize the variations in the blank.

Table I. Results Obtained in Controls

Compound	Per Cent Oxygen		
	Found	Calculated	Difference
1. Benzoic acid	26.46	26.20	+ 0.26
	26.35		+ 0.15
	26.27		+ 0.07
2. Vanillin	31.35	31.55	— 0.20
	31.50		— 0.05
3. *m*-Hydroxy benzaldehyde	26.17	26.20	— 0.03
4. Camphor	10.69	10.51	+ 0.18
5. Anthraquinone	15.30	15.37	— 0.07
6. Deoxy-anisoin	18.60	18.73	— 0.13
7. 4-Hydroxy coumarin	29.58	29.60	— 0.02
8. 6-Methyl 4′-methoxy flavan 3 : 4 diol cyclic carbonate	25.50	25.62	— 0.12
9. 6-Methyl 4′-methoxy flavone	18.22	18.03	+ 0.19
10. 7,4′-Dimethoxy flavan 3 : 4 diol	26.26	26.46	— 0.20
11. 4-Tertiary butyl benzanthrone	5.51	5.59	— 0.08
12. Pyrogallol trimethyl ether	28.70	28.54	+ 0.16
13. Diethyl Stilbestrol dimethyl ether	11.09	10.80	+ 0.29
14. 5,7,2′,4′ Tetramethoxy flavone	27.74	28.04	+ 0.30

High values result from the consumption of the paraffin wax. Low results are frequently caused by a deposit of carbon covering the surface

of the catalyst as happens when certain heterocyclic compounds are burned. It is then necessary to remove the carbon deposit by heating the pyrolysis tube with a current of air passing through. After sweeping the tube over night with a slow current of purified nitrogen, it can be used for further analyses. The copper oxide of the carbon monoxide converter is regenerated after every fifty determinations although it can be used without regenerating for many more analyses. Its action is restored by a current of air and raising the temperature of the furnace to 700° C.

Acknowledgment

The authors wish to express their gratitude to Dr. *Sukh Dev* and Dr. *R. C. Shah* for their keen interest and valuable suggestions during the investigation.

Summary

A simple procedure for the determination of oxygen has been tried with compounds containing carbon, hydrogen, and oxygen. It has the advantage that a temperature of 700° C is sufficient.

Zusammenfassung

Eine einfache Verbrennungsmethode zur Bestimmung von Sauerstoff, für die eine Temperatur von 700° C ausreicht, wurde an Verbindungen, die nur Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff enthalten, erprobt.

Résumé

On a essayé une méthode simple pour doser l'oxygène dans des composés contenant du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Elle a l'avantage de ne pas nécessiter une température supérieure à 700° C.

Literature

[1] *M. Schütze*, Z. analyt. Chem. **118**, 241, 245 (1939).
[2] *W. Zimmermann*, Z. analyt. Chem. **118**, 258 (1939).
[3] *J. Unterzaucher*, Ber. dtsch. chem. Ges. **73 B**, 391 (1940); Analyst **77**, 584 (1952); Mikrochem. **36/37**, 706 (1951); Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 822.
[4] *K. Bürger*, Mikrochim. Acta [Wien] **1957**, 313.
[5] *V. A. Campanile, J. H. Badley, E. D. Peters, E. J. Agazzi*, and *F. R. Brooks*, Analyt. Chemistry **23**, 1421 (1951).
[6] *J. P. Dixon*, Analyt. Chim. Acta **19**, 141 (1958).
[7] *M. Dundy* and *E. Stehr*, Analyt. Chemistry **23**, 1408 (1951).
[8] *F. Ehrenberger, S. Gorbach* and *W. Mann*, Mikrochim. Acta [Wien] **1958**, 778.
[9] *C. C. Harris, D. M. Smith* and *J. Mitchell*, Analyt. Chemistry **22**, 297 (1950).
[10] *J. Holowchak* and *G. E. C. Wear*, Analyt. Chemistry **23**, 1404 (1951).
[11] *W. H. Jones*, Analyt. Chemistry **25**, 1449 (1953).
[12] *W. Kirsten*, Mikrochem. **36/37**, 609 (1951); Analyt. Chemistry **25**, 74 (1953).

[13] *W. Schöniger*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 863.
[14] *Al Steyermark*, J. Assoc. Offic. Agric. Chemists **41**, 299 (1958).
[15] *A. F. Colson*, Analyst **79**, 784 (1954).
[16] *A. Lacourt*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 735.
[17] *L. J. Moelants* and *W. Wesenbeek*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 738.
[18] Report of discussion at the meeting of the American Chemical Society, Chicago, September, 1950. Analyt. Chemistry **23**, 530 (1951).
[19] *A. M. Canales* and *T. D. Parks*, Analyt. Chim. Acta **15**, 25 (1956).
[20] *J. Körbl*, Ind. Chemist **34**, 563 (1958).
[21] *C. L. Ogg*, Analyt. Chemistry **28**, 766 (1956).
[22] *T. S. Ma*, Analyt. Chemistry **30**, 760 (1958).
[23] *I. J. Oita* and *H. S. Conway*, Analyt. Chemistry **26**, 600 (1954).
[24] *F. H. Oliver*, Analyst **80**, 593 (1955).
[25] *J. B. Niederl* and *V. Niederl*, Micromethods of Quantitative Organic Analysis. New York: Wiley. 1948. p. 122.

Aus der Ärztlichen Abteilung der Farbenfabriken Bayer AG., Leverkusen

Methode zur photometrischen Mikrobestimmung kleiner Mengen β-Naphthol in Gegenwart eines großen Überschusses verschiedener β-Naphthylester-Emulsionen und deren Verwendung zur Bestimmung der „Aromatischen Esterase" in biologischem Material*

Von

W. Pilz

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 2. Mai 1961)

1. Allgemeines

Nach Befunden von *Nachlas* und *Seligman*[1] (seit 1949) sind Homogenisate aus Leber und Pankreas in der Lage, verschiedene Ester des β-Naphthols fermentativ zu spalten. In jüngster Zeit fand *Augustinsson*[2] eine Spaltfähigkeit des menschlichen Serums für Phenylester.

Während *Augustinsson*[2] mit Essigsäurephenylester arbeitet und die Aktivität des Serums manometrisch nach der Methode von Warburg mißt, führen andere Autoren (*Nachlas* und *Seligman*[3], *Seligman, Nachlas* und *Mollomo*[4], *Seligman* und *Nachlas*[5] sowie *Ravin* und *Seligman*[6]) die Aktivitätsmessung durch eine Bestimmung des enzymatisch aus seinen Estern in Freiheit gesetzten β-Naphthols durch.

Zur Sichtbarmachung in Gewebsstücken wurde das β-Naphthol mit diazotiertem 1-Naphthylamin gekuppelt, wobei ein weitgehend unlöslicher rosaroter Farbstoff erhalten wird[1], der im Mikroskop deutlich sichtbar sein soll. Alle anderen Untersuchungen[3–6] wurden nach der Methode von *Seligman* und *Nachlas*[5] durchgeführt.

Diese Autoren setzen den Fermentansatz nach der Inkubation mit einer wäßrigen Lösung des in fester Form käuflichen Tetrazoniumsalzes des o-Dianisidins um und extrahieren den erhaltenen roten Farbstoff

* Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.. Dr. Ing. *G. Gorbach*, zum 60. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet.

mit Essigsäureäthylester. Nach dem Abtrennen der organischen Phase wird zentrifugiert und bei 540 nm photometriert. Eine Nachprüfung dieser Methode ergab, daß

1. der nach den Angaben dieser Autoren erhaltene Farbstoff nicht dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt,

2. deutliche Verluste durch Abdampfen des Essigsäureäthylesters unvermeidbar sind, wodurch große Schwankungen in den Einzelbestimmungen auftreten, und

3. die erhaltene Eichkurve nicht durch den Koordinatenursprung verläuft.

Nach *Seligman*, *Nachlas* und *Mollomo*[4] soll das Lambert-Beersche Gesetz nur in einem Bereich zwischen 5 und 10 μg β-Naphthol erfüllt sein, während *Nachlas* und *Seligman*[3] Linearität zwischen Konzentration und Extinktion im Bereich zwischen 5 und 50 μg β-Naphthol fanden. In einer ausführlichen Beschreibung der Methode von *Seligman* und *Nachlas*[5] wird die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes im Bereich zwischen 10 und 50 μg festgestellt. Für die praktische Anwendung der Methode würde das bedeuten, daß man stets in einem Bereich bleiben müßte, der zwischen 10 und 50 μg in Freiheit gesetzten β-Naphthols liegt. Abgesehen davon, daß das eine kaum einzuhaltende Bedingung ist, konnten wir feststellen, daß die Funktion zwischen Extinktion und Konzentration auch in diesem Bereich keineswegs durch eine Gerade darstellbar ist, sondern daß es sich lediglich um ein sehr kleines Stück einer gekrümmten Kurve handelt, das — entsprechend graphisch in die Länge gezogen — annähernd als Gerade erscheint.

Die Verluste, die durch Abdampfen des Essigsäureäthylesters entstehen (wodurch jeweils höhere Extinktionen gefunden werden), sind nicht unter Kontrolle zu bringen. Selbst wenn man stets in geschlossenen Gefäßen arbeitet und bei der photometrischen Messung Küvetten mit eingeschliffenem Deckel verwendet, treten bereits beim Umfüllen des Lösungsmittels von einem Gefäß in das andere so starke Verluste ein, daß eine exakte photometrische Bestimmung nicht mehr möglich ist.

Daß die erhaltene Eichkurve nicht durch den Koordinatenursprung geht, konnte mit eigenen Versuchen nachgewiesen werden. Allerdings geht diese Tatsache schon aus der Publikation von *Seligman* und *Nachlas*[5] hervor, sie wurde jedoch von allen weiteren Bearbeitern nicht beachtet.

Daraus folgt, daß die bisher übliche photometrische Methode zur Bestimmung der „A"-Esterase (die „Aromatische Esterase" ist ein verschiedene Ester des Phenols und insbesondere des β-Naphthols spaltendes Ferment; ein Ferment dieses Typs ist z. B. im menschlichen Serum enthalten) unzulänglich ist. Sie wird trotzdem seit etwas mehr als 10 Jahren kritiklos allgemein verwendet, was dazu führte, daß das gesamte System der „A"-Esterasen unrichtig beschrieben wurde. Zweifellos liegt darin auch

die Ursache für die vielen sich zum Teil in wesentlichen Punkten widersprechenden Befunde, die in letzter Zeit über das Naphthylester spaltende Ferment publiziert wurden (z. B. *Katz*[7] sowie *Delcourt*, *Rubin*, *Palmer* und *Kirschner*[8]). Von vielen anderen Untersuchern verwendete Methoden wurden entweder gar nicht oder nur sehr mangelhaft beschrieben, weshalb die erhaltenen Ergebnisse auch nicht miteinander verglichen werden können.

Voraussetzung zu einem Studium der „A"-Esterase ist eine exakte und allgemein anwendbare Methode. Da ein solches auch für den Routinebetrieb brauchbares Verfahren bisher nicht vorliegt, wurde eine neue Methode erarbeitet, worüber im folgenden berichtet wird. Die analytische Problematik dieser Aufgabe besteht darin, kleinste Mengen freien β-Naphthols in Gegenwart eines großen Überschusses (meist in Emulsionen vorliegend) von β-Naphthylestern zu bestimmen, wobei besonders darauf zu achten war, daß diese Ester nicht durch methodisch bedingte Maßnahmen verseift werden und so größere Mengen freien β-Naphthols auftreten, als tatsächlich enzymatisch gebildet wurden. Außerdem mußten eventuelle Störungen durch sonstiges biologisches Material ausgeschlossen werden.

2. Prinzip der Methode

Verschiedene Ester des β-Naphthols werden in Emulsion als Substrat vorgelegt, mit biologischem Material zusammengebracht und die enzymatische Reaktion nach der Bebrütung durch Zusatz von Trichloressigsäure abgestoppt. Das bis zu diesem Zeitpunkt in Freiheit gesetzte β-Naphthol wird mit diazotiertem 4-Aminophenetol gekuppelt, mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und der entstandene orangerote Azofarbstoff mit n-Pentanol extrahiert.

Dieser Farbstoff erfüllt das Lambert-Beersche Gesetz im Bereich von 0,1 bis mindestens 50 μMol β-Naphthol, die erhaltene Eichkurve geht durch den Koordinatenursprung, weshalb das Resultat direkt ohne Zuhilfenahme einer Eichkurve aus den abgelesenen Extinktionen errechnet werden kann. Verluste durch Abdampfen des organischen Extraktionsmittels (n-Pentanol-1, Kp. 138°) sind nicht zu befürchten und lassen sich experimentell auch nicht nachweisen.

In Analogie zu früher beschriebenen Methoden der Fermentanalyse *(W. Pilz*[9]*)* wird zu jedem Ansatz mit biologischem Material ein Leeransatz, der nur Substrat und an Stelle des biologischen Materials 0,9%ige Kochsalzlösung enthält, mitgemacht, um auf diese Weise die Eigenverseifung der Substrate, die stets in meßbarer Weise auftritt (z. B. Bebrütung 30 Minuten, 37°, $p_H > 7$), rechnerisch ausschließen zu können.

Weiters wurden eingehende Studien über die Zusammensetzung und Herstellung der Substrate angestellt, da wir unter anderem auch fanden,

daß eine Herstellung der Substrate, wie sie z. B. bei *Ravin* und *Seligman*[6] beschrieben ist, kein eindeutiges Bild der „A"-Esterase liefern kann, da diese Substrate 2,5 ml Aceton in 50 ml Substrat enthalten; wie zu zeigen sein wird, hemmt diese Menge Aceton die Fermentaktivität bereits sehr erheblich.

3. Die Bestimmung von β-Naphthol in wäßrigen Lösungen

Für alle hier beschriebenen Versuche wurde eine gepufferte Lösung von β-Naphthol verwendet, die in 1 ml 3 μMol β-Naphthol enthielt. Gegebenenfalls wurde diese Lösung im Verhältnis 1 : 10 mit demselben Puffer verdünnt. Ansonsten wurden nur die in Abschnitt 6 angegebenen Reagenzien und Lösungen verwendet.

Zur Festlegung des Absorptionsmaximums wurde eine $3 \cdot 10^{-3}$-m Lösung von β-Naphthol in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, 5 ml Diazoniumlösung und 10 ml $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt, 20 Minuten stehen gelassen, mit 25 ml Extraktionsmittel versetzt, der Meßkolben verschlossen und von Hand kräftig durchgeschüttelt, die organische Phase in Zentrifugenröhrchen abgegossen, diese nach Zusatz von etwas wasserfreiem Natriumsulfat verschlossen, durchgeschüttelt und bei 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Ein gleichzeitig angesetzter Leerwert enthielt nur Diazoniumlösung, $NaHCO_3$-Lösung und Extraktionsmittel, wurde aber ebenfalls vor der Extraktion 20 Minuten stehen gelassen. In einem Teil des organischen Extraktes wurde das Spektrum (gegen den Extrakt des Leerwertes!) von 400 bis 600 nm vermessen. Dabei zeigte sich, daß bei 420 nm ein niedriges Maximum und das Hauptmaximum bei 465 nm liegt (vgl. Abb. 1).

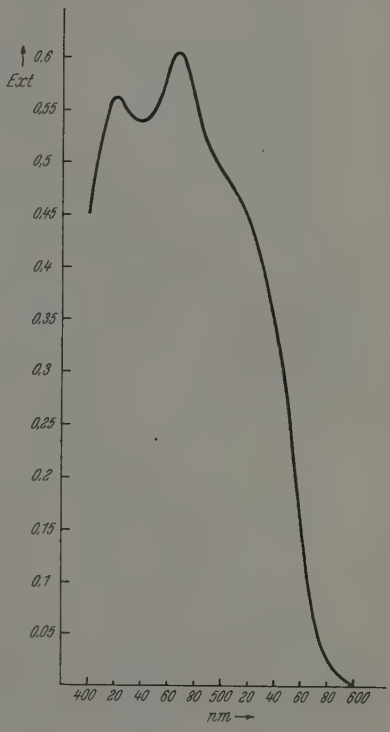


Abb. 1. Spektrum

2,5 ml organischer Extrakt wurde im Verhältnis 1 : 10 mit n-Pentanol verdünnt und auch in der so verdünnten organischen Phase das Spektrum

vermessen. Auch hier zeigt sich ein niedriges Maximum bei 420 nm und das Hauptmaximum bei 465 nm.

In der gleichen Weise wurden Eichkurven mit β-Naphtholmengen von 0,1 bis 50,0 μMol aufgestellt. Es herrscht strenge Linearität in der Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration. Das Lambert-Beersche Gesetz ist somit erfüllt.

Ein Ansatz bekannten Gehaltes wurde bei verschiedenen Schichtdicken gemessen und dabei gefunden, daß das Verhältnis zwischen Schichtdicke und Extinktion linear ist: das Lambertsche Gesetz ist somit auch erfüllt.

Es ist daher möglich, das Resultat direkt aus der abgelesenen Extinktion zu errechnen. Als Berechnungsfaktor wurde $F = 4{,}0$ gefunden.

Da nicht von vornherein mit Sicherheit angenommen werden konnte, daß unabhängig vom Volumen der wäßrigen Phase bei Verwendung der gleichen Menge des Extraktionsmittels stets die Gesamtmenge des gebildeten Farbstoffes in die organische Phase geht, wurde unter sonst gleichbleibenden Bedingungen das Volumen der wäßrigen Phase in den für die Praxis notwendigen Grenzen variiert.

Dazu wurden in 250-ml-Meßkolben jeweils 10 ml ($\hat{=}$ 3 μMol) einer β-Naphthollösung pipettiert, verschiedene Mengen Wasser zugefügt, alle Ansätze weiter wie oben beschrieben aufgearbeitet und alle mit 25 ml Extraktionsmittel extrahiert. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Extinktion vom Volumen der wäßrigen Phase bei Konstanthaltung der organischen Phase

ml Wasser zugesetzt	Volumen der wäßrigen Phase während der Extraktion (ml)	Ext. $^{465\text{ nm}}_{5\text{ mm}}$
5	30	0,745
10	35	0,750
15	40	0,748
20	45	0,755
25	50	0,746
30	55	0,750
40	65	0,748
50	75	0,754
60	85	0,750

Wie ersichtlich, ist das Volumen der wäßrigen Phase in wesentlich weiteren Grenzen variierbar, als für die später zu beschreibende Methode zur Bestimmung der fermentativen Hydrolyse von β-Naphthylestern notwendig ist. Eine Beeinflussung der Resultate tritt dabei nicht ein.

Zu Prüfung der Abhängigkeit der Extinktion von der Menge der zugesetzten $NaHCO_3$-Lösung wurden in 100-ml-Meßkolben jeweils 10 ml einer β-Naphthollösung (≡ 3 μMol) pipettiert, dazu 5 ml Diazoniumlösung und verschiedene Mengen $NaHCO_3$-Lösung gefügt, nach 20 Minuten mit 25 ml n-Pentanol extrahiert und weiter wie in Abschnitt 7 beschrieben aufgearbeitet. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Extinktion von der verwendeten Menge $NaHCO_3$-Lösung

ml $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt	Volumen der wäßrigen Phase während der Extraktion (ml)	Ext. $^{465\text{ nm}}_{5\text{ mm}}$
1	16	0,643
2	17	0,698
3	18	0,739
4	19	0,752
5	20	0,747
7	22	0,753
10	25	0,752
12	27	0,748
15	30	0,724
20	35	0,695

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß zwischen 4 und 12 ml zugesetzter Menge $NaHCO_3$-Lösung die Extinktion konstant bleibt. Da die Fermentanalysen nach dem Abstoppen des enzymatischen Prozesses ein p_H von zirka 4 haben, waren für die praktische Arbeitsweise 10 ml $NaHCO_3$-Lösung vorzuschreiben.

Tabelle 3. Abhängigkeit der Extinktion von der Wartezeit zwischen Neutralisation und Extraktionsbeginn

Zeit (min)	Ext. $^{465\text{ nm}}_{5\text{ mm}}$	μMol β-Naphthol gefunden
5	0,340	1,360
10	0,363	1,450
15	0,376	1,504
20	0,374	1,496
25	0,378	1,512
30	0,372	1,488
45	0,375	1,500
60	0,352	1,410

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Extinktion von der zwischen Neutralisation und Extraktionsbeginn liegenden Zeit (Geschwindigkeit der Farbstoffentwicklung unter den Bedingungen der Arbeitsvorschrift)

wurden in 100-ml-Meßkolben 5 ml (≡ 1,5 μMol β-Naphthol) Titerlösung pipettiert, 5 ml Diazoniumlösung und 10 ml $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt und nach verschiedenen Zeitabständen mit der Extraktion begonnen (selbstverständlich wurde zu jedem Ansatz ein entsprechender Leerwert angesetzt, der vor Extraktionsbeginn die gleiche Zeit stand wie der Ansatz). Einige der erhaltenen Resultate sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Wie ersichtlich, beträgt die Mindestwartezeit 15 Minuten. Die Ansätze können jedoch vor der Extraktion unbedenklich bis zu 45 Minuten stehen. Da über dieses Bereich Konstanz herrscht, war im Interesse einer möglichst kurzen Arbeitszeit für die praktische Analyse eine Wartezeit von 20 Minuten vorzuschreiben.

Tabelle 4. Stabilität der Färbung

μMol β-Naphthol	Ext. $^{465\ nm}_{5\ mm}$ (nach 10 min)	Ext. $^{465\ nm}_{5\ mm}$ (nach 64 Stdn.)
0,3	0,075	0,074
0,6	0,149	0,153
0,9	0,222	0,226
1,2	0,300	0,293
1,5	0,375	0,371
2,1	0,522	0,526
3,0	0,745	0,752
6,0	0,152*	0,148*
7,0	0,175*	0,175*
10,0	0,252*	0,250*
15,0	0,376*	0,373*
20,0	0,499*	0,510*
25,0	0,625*	0,622*
30,0	0,752*	0,750*
38,0	0,946*	0,950*

* Die Lösungen wurden im Verhältnis 1 : 10 mit Extraktionsmittel verdünnt, vgl. Arbeitsvorschrift.

Es war noch von Interesse, die Stabilität des in Pentanol gelösten Farbstoffes zu überprüfen. Dazu wurden die Extrakte, die zur Aufstellung einer Eichkurve dienten, unmittelbar nach ihrer Fertigstellung und ein zweites Mal nach Ablauf von 64 Stunden (in der Zwischenzeit standen die Pentanollösungen wohl verschlossen) gemessen und dabei unter anderem die in Tabelle 4 wiedergegebenen Resultate erhalten, aus denen hervorgeht, daß pentanolische Farbstofflösungen ihre Extinktion über wenigstens 64 Stunden nicht ändern. Aus Gründen der Zeitersparnis war für die praktische Analyse die photometrische Messung unmittelbar nach dem Zentrifugieren vorzuschreiben. In besonderen Fällen kann jedoch mit der Messung beliebig lange (maximal 64 Stunden) zugewartet werden.

Da bei Fermentanalysen nach einem bereits früher bekanntgegebenen Prinzip *(W. Pilz*[9]*)* stets gegen einen die Blindspaltung anzeigenden Wert (Vergleichswert) gemessen werden muß, um diese Blindspaltung (die nicht fermentativ bedingt ist) ausschalten zu können, wurde weiterhin untersucht, ob mit der vorliegenden Methode auch Differenzmessungen möglich sind.

Dazu wurde z. B. ein Ansatz von 6 μMol β-Naphthol gegen einen zweiten, der 4 μMol β-Naphthol enthielt, gemessen; der Ansatz mit der geringeren Konzentration an β-Naphthol wurde also als Leerwert geschaltet. Es war zu erwarten, daß das Resultat der Konzentrationsdifferenz zwischen beiden Ansätzen (in diesem Falle 2 μMol) entsprach, da der Blindwert der Reagenzien bei dieser Art der Messung herausfällt. Im einzelnen wurden z. B. folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 5. Differenzmessungen

Konzentrationsdifferenz (μMol β-Naphthol)	Ext. 465 nm 5 mm	μMol β-Naphthol gefunden	Fehler (μMol β-Naphthol)
0,6	0,149	0,596	— 0,004
	0,151	0,604	+ 0,004
	0,153	0,612	+ 0,012
3,0	0,748	2,992	— 0,008
	0,756	3,024	+ 0,024
	0,762	3,048	+ 0,048
6,0	0,148*	5,920	— 0,080
	0,151*	6,040	+ 0,040
	0,150*	6,000	± 0,000
24,0	0,595*	23,800	— 0,200
	0,601*	24,040	+ 0,040
	0,600*	24,000	± 0,000

* Die Lösungen wurden im Verhältnis 1 : 10 mit Extraktionsmittel verdünnt, vgl. Arbeitsvorschrift.

Wie aus diesen Resultaten hervorgeht, können Differenzmessungen nach der oben beschriebenen Art ohne weiteres durchgeführt werden.

4. Bestimmung kleiner Mengen freien β-Naphthols in konz. Emulsionen von β-Naphthylestern

Zur Prüfung, ob die Methode auch zur Bestimmung kleiner Mengen von β-Naphthol in Gegenwart eines großen Überschusses von β-Naphthylestern verwendbar ist, wurden verschiedenen β-Naphthylester-Emulsionen jeweils 1,5 μMol β-Naphthol zugesetzt und die so bereiteten Lösungen nach Arbeitsvorschrift analysiert. Die Emulsionen wurden wie in Abschnitt 5 ausführlich beschrieben hergestellt. Dabei wurden unter anderem die in Tabelle 6 erhaltenen Resultate gewonnen.

Tabelle 6. Bestimmung kleiner Mengen von β-Naphthol in Gegenwart eines großen Überschusses von emulgierten β-Naphthylestern

Ext. $^{465\,nm}_{5\,mm}$	μMol β-Naphthol gefunden	Fehler (μMol β-Naphthol)
a) Vorgelegt: 20 μMol Propionsäure-β-Naphthylester + 1,5 μMol β-Naphthol		
0,367	1,468	— 0,032
0,383	1,532	+ 0,032
0,378	1,512	+ 0,012
b) Vorgelegt: 40 μMol Buttersäure-β-Naphthylester + 1,5 μMol β-Naphthol		
0,378	1,512	+ 0,012
0,370	1,480	— 0,020
0,375	1,500	± 0,000
c) Vorgelegt: 80 μMol Laurinsäure-β-Naphthylester + 1,5 μMol β-Naphthol		
0,377	1,508	+ 0,008
0,375	1,500	± 0,000
0,383	1,532	+ 0,032

Wie zu ersehen ist, kann nach dieser Methode auch β-Naphthol in Gegenwart sehr großer Mengen teils gelöster, teils emulgierter β-Naphthylester mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Versuche mit den gleichen β-Naphtholmengen (1,5 μMol) und Zusatz verschiedener Ester des β-Naphthols bis zu maximal 500 μMol Ester in insgesamt 25 ml Emulsion zeigten, daß die Fehlergrenze der Methode mindestens bis zu der erwähnten Esterkonzentration unabhängig von der Menge und Art der anwesenden β-Naphthylester ist. Die bei der Bestimmung des freien β-Naphthols auftretenden Abweichungen bleiben in diesen Fällen in derselben Größenordnung wie in Tabelle 6 wiedergegeben. Das gilt jedoch nur für nach Abschnitt 5 frisch hergestellte Emulsionen unter der Bedingung, daß die als Ausgangssubstanzen verwendeten β-Naphthylester analysenrein und insbesondere frei von unverestertem β-Naphthol sind. Bereits in einer Emulsion von z. B. Essigsäure-β-Naphthylester, die in 20 ml 200 μMol Ester enthielt und nach Herstellung bei p_H 7,2 1 Stunde gestanden ist, lassen sich kleinste Mengen freies β-Naphthol bestimmen, das ohne Zweifel aus einer Verseifung des Esters stammen muß, da in einer unmittelbar nach der Herstellung analysierten Emulsion gleicher Zusammensetzung freies β-Naphthol auch nicht in Spuren nachweisbar ist.

Somit sind in dem hier beschriebenen Verfahren alle Unsicherheiten und Fehlerquellen umgangen, die den früher von anderen Autoren beschriebenen Methoden anhaften.

5. Herstellung von β-Naphthylester-Emulsionen, Substrate

Sämtliche zur Herstellung von Substraten in Frage kommenden Naphthylester sind in Wasser sehr schwer löslich bis unlöslich. Es ist deshalb notwendig, mit wäßrigen Emulsionen zu arbeiten.

Ravin und *Seligman*[6] lösen den Ester in Aceton und verdünnen die acetonische Lösung ohne Anwendung von Emulgatoren unter Rühren mit einem Veronalpuffer nach *Michaelis*[10], die anderen Autoren[1,3–5,7,8] bereiten die Substrate in gleicher oder ähnlicher Weise; gelegentlich wird an Stelle von Aceton Glykolmonomethyläther oder Methanol verwendet.

Der Einfluß von Menge und Art verschiedener organischer Lösungsmittel wurde systematisch studiert. Dazu wurde die Abhängigkeit der Aktivität der Serum-„A"-Esterase des Menschen von Art und Menge verschiedener im Substrat anwesender organischer Lösungsmittel in der weiter unten beschriebenen Weise untersucht. Als Substrat wurde Essigsäure-β-Naphthylester verwendet. Die Resultate sind in Abb. 2 zusammengefaßt.

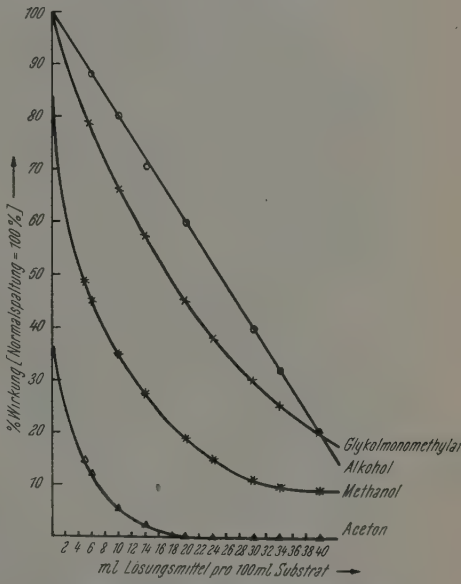


Abb. 2. Wirkung organischer Lösungsmittel auf die „A"-Esterase des menschlichen Serums. (Zur Definition des Begriffes „Wirkung" vgl. Abschn. 8)

Daraus wird klar, daß die von den verschiedenen Autoren[1,3–8] verwendeten organischen Lösungsmittel Aceton, Glykolmonomethyläther und Methanol für die Herstellung der Substrate ausscheiden, da sie stark hemmen, so daß Fermentbestimmungen bei Verwendung solcher Substrate irreführende Resultate ergeben müssen.

Nach den Angaben der Autoren (vgl. [6]) enthalten die von ihnen verwendeten Substrate 5 ml Aceton in 100 ml Substrat. Wie aus den Kurven in Abb. 2 ersichtlich ist, wird dadurch das Ferment so weit gehemmt (offensichtlich durch Ausfällung des entsprechenden Eiweißkörpers), daß nur mehr etwa 15% der ursprünglichen Fermentaktivität erhalten bleiben. Bei Verwendung der gleichen Menge Glykolmonomethyläther bleiben etwa 75% der ursprünglichen Aktivität erhalten, während bei

Verwendung von 1 ml reinem Alkohol auf 100 ml Substrat noch mindestens 95% der Ausgangsaktivität vorhanden sind.

Daher bereiteten wir die Substrate durch Lösen der Ester in reinem Alkohol und Vermischen mit der entsprechenden Menge Puffer, wobei in 100 ml Substrat nur 1 ml Alkohol enthalten ist. Die maximal dadurch bewirkte Hemmung beträgt 5% und ist in Wirklichkeit meist geringer, da die Hauptmenge des Alkohols beim Emulgieren verdunstet.

β-Naphthylester der Fettsäuren C_2 bis C_5 sind in Alkohol ausreichend löslich, so daß die Herstellung der Substrate auf diese Weise keine Schwierigkeiten bereitet. Bei Estern mit höheren Fettsäuren reicht die Löslichkeit in Alkohol nicht aus, weshalb zu anderen Lösungsmitteln gegriffen werden muß. Aceton hat sich am besten bewährt, weil es bei hohem Lösungsvermögen leicht flüchtig ist. Es ist nämlich notwendig, nach dem Emulgieren der acetonischen Lösung mit dem Puffer das Aceton im Hochvakuum abzuziehen, wodurch praktisch von organischen Lösungsmitteln freie Substrate erhalten werden. Nur bei der Verwendung von Alkohol kann man auf das Abziehen des Lösungsmittels verzichten, sofern nicht mehr als 1 ml je 100 ml Substrat verwendet wurde.

Es wurde weiter festgestellt, daß nicht nur der Lösungsmittelgehalt, sondern auch die Teilchengröße der Emulsionen großen Einfluß auf die Aktivität der zu untersuchenden Fermente hat. Je kleiner die Teilchengröße, um so größer wird die Spaltaktivität ein und desselben biologischen Materials. Sehr fein verteilte Emulsionen können im Mixer hergestellt werden, sind jedoch nur für wenige Minuten haltbar; schon während des Bebrütens tritt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Zusammenballung der Teilchen in unkontrollierbarer Weise ein, was zu weiteren ins Gewicht fallenden Fehlern führen kann.

Es war deshalb notwendig, ein Schutzkolloid und zusätzlich einen Stabilisator zu verwenden, um Substrate zu erhalten, die während der Zeit der Analyse stabil bleiben und auch bei einer etwaigen Verlängerung der Bebrütungszeit noch reproduzierbare Werte liefern. Die handelsübliche Gelatine schied als Schutzkolloid aus, da sie mit diazotiertem 4-Aminophenetol eine Gelbfärbung liefert, die mit Pentanol aus Wasser extrahierbar ist. Mit gutem Erfolg konnte Gummi arabicum von Merck verwendet werden. Als Stabilisator hat sich d-Glukose bewährt.

Ein optimaler Verteilungsgrad wird erreicht, wenn man eine gemessene Menge Puffer, der Schutzkolloid und Stabilisator bereits enthält, im Mixer bei maximaler Drehzahl rührt, die berechnete Menge der alkoholischen Esterlösung aus einer Pipette zutropfen läßt und wenigstens 3 Minuten weiterrührt.

Ein nach diesen Gesichtspunkten gewonnenes Substrat wurde unmittelbar nach Fertigstellung und dann später in regelmäßigen Zeitabständen auf seinen Gehalt an freiem β-Naphthol (aus der Eigenhydrolyse

entstanden) analysiert. Damit wird die Haltbarkeit eines nach obigen Grundsätzen hergestellten Substrates geprüft. Das Substrat (400 μMol Essigsäure-β-Naphthylester in 200 ml Lösung, p_H 7,2) stand während der gesamten Beobachtungszeit (10 Tage) wohl verschlossen bei 37° im Brutschrank. Es wurden dabei folgende Resultate erhalten (s. Tabelle 7).

Es zeigt sich, daß nahezu lineare Abhängigkeit zwischen Zeit und Eigenhydrolyse besteht. Die Zerfallsrate pro Tag beträgt etwa 0,38 μÄq pro 10 ml Substrat bei einem Estergehalt des Substrates von 20 μMol pro 10 ml. Die Höhe des Selbstzerfalles der Substrate ist stark von der Art des Esters abhängig; so ist bei Estern mit höheren Fettsäuren (z. B. Laurinsäure-β-Naphthylester) nach 3 Tagen Beobachtungszeit unter denselben Bedingungen praktisch noch keine Eigenhydrolyse nachweisbar. In der in Abschnitt 7 beschriebenen Arbeitsweise wird eine allfällige Eigenverseifung durch die Vergleichswerte gemessen und bei der Errechnung des Resultates berücksichtigt.

Tabelle 7. Beständigkeit eines Substrates von Essigsäure-β-Naphthylester bei p_H 7,2 und 37°

Zeit (Tage)	μMol durch Eigenverseifung entstandenes β-Naphthol je 10 ml Substrat
0*	0
1	0,38
2	0,77
3	1,03
5	1,60
6	1,86
7	2,20
9	2,70
10	3,12

* Unmittelbar nach Herstellung des Substrates.

Bei der Untersuchung und Definition von Fermenten sollte nach Möglichkeit bei deren p_H-Optimum gearbeitet werden. Die in Abschnitt 7 in allen Einzelheiten beschriebene Methode basiert auf Substraten vom p_H 7,2. Bei der Untersuchung von β-Naphthylester spaltenden Fermenten, die ihr p_H-Optimum nicht bei 7,2 haben, kann unbedenklich ein anderer Puffer derselben Ionenstärke, der jedoch die gleiche Menge Gummi arabicum und Glukose enthalten muß, verwendet werden.

Die unten angegebene Arbeitsweise sollte möglichst allgemein anwendbar sein. Die hier geschilderte analytische Methode zur Messung der Aktivität von Fermenten, die β-Naphthylester spalten (es ist nach unseren bisherigen Untersuchungen wahrscheinlich, daß es deren eine ganze Reihe gibt), und das beschriebene Verfahren zur Herstellung entsprechender Substrate dient als zuverlässige Grundlage zur Erforschung der für ein Ferment charakteristischen Größen (Konzentrationsoptimum des Substrates, p_H-Optimum, der zu verwendende Ester, die reaktionskinetischen Konstanten usw.). Erst wenn diese bekannt sind, können sie in die vorliegende allgemeine Methode eingeordnet werden, wodurch eine spezielle, zur Erforschung eines bestimmten Fermentes anwendbare Arbeitsweise erhalten wird.

Die hier wiedergegebene Methode ist so allgemein und (in bezug auf die oben genannten Größen) in so weiten Grenzen variierbar, daß auch bei Auftreten extremer Fermentcharakteristika methodische Fehler praktisch ausgeschlossen sind.

So wurden z. B. mit Hilfe der hier wiedergegebenen Methode die Charakteristika der beiden β-Naphthylester spaltenden Enzyme des menschlichen Serums bestimmt und durch deren Berücksichtigung eine spezielle Methode für die routinemäßige Bestimmung dieser beiden Fermente erhalten *(W. Pilz*[11]*)*.

6. Reagenzien und Lösungen

Diazoniumlösung: 0,3 ml frisch dest. 4-Aminophenetol (Kp. 111°/5 mm, farblose Flüssigkeit) werden in einem 100-ml-Meßkolben in 5 ml 1-n Salzsäure gelöst, etwas Eis (aus dest. Wasser bereitet) zugesetzt und mit 5 ml 10%iger Na-Nitritlösung diazotiert. Nach 5 Minuten setzt man 20 ml einer 10%igen Sulfaminsäurelösung zu, schwenkt stark um, um den Stickstoff soweit als möglich zu vertreiben, und füllt mit Wasser zur Marke auf. Die Lösung ist farblos bis schwach gelblich gefärbt und bei Zimmertemperatur einen Tag haltbar. Sobald sie sich nach braun verfärbt, ist sie zu verwerfen.

$NaHCO_3$-Lösung: 0,5-m; 42,0 g $NaHCO_3$ (Merck) werden mit Wasser zu 1000 ml gelöst.

Extraktionsmittel: Frisch dest. n-Pentanol-(1), Kp. 138°.

Puffer, p_H 4,62: 200 ml 1-n Essigsäure + 100 ml 1-n NaOH werden in einem 1000-ml-Meßkolben zur Marke aufgefüllt. Kontrolle durch elektrometrische p_H-Messung.

Boratlösung: 31,0 g Borsäure, $B(OH)_3$ (Merck), werden in einem 1000-ml-Meßkolben in zirka 700 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 20 ml 1-n NaOH zur Marke aufgefüllt.

Puffer: In einem 1-l-Erlenmeyerkolben werden 20 ml Puffer p_H 4,62 und 200 ml Boratlösung mit zirka 500 ml Wasser gemischt, dazu 4 g Gummi arabicum (Merck) und 4 g Traubenzucker (Dextropur) gefügt, unter vorsichtigem Umschwenken erwärmt und 5 Minuten im Sieden gehalten. Nach dem Abkühlen füllt man in einen 1000-ml-Meßkolben, spült mit Wasser gut nach und füllt zur Marke auf. Nach dem Durchmischen setzt man ein Kriställchen Quecksilber(II)-jodid zu.

Substratstammlösung: 10 mMol Ester werden eingewogen, mit reinem Alkohol in einem 50-ml-Meßkolben gelöst und zur Marke aufgefüllt. Ester, die sich in Alkohol nicht genügend lösen, werden in der gleichen Weise in Aceton gelöst. Die Stammlösungen sind mindestens 1 Woche haltbar.

Substrat: 100 ml Puffer (s. oben) werden im Mixer mit maximaler Drehzahl gerührt. Man läßt, ohne das Rühren zu unterbrechen, 1 ml Substratstammlösung langsam aus einer Pipette zufließen und rührt mit derselben Drehzahl noch 5 Minuten weiter. Wurde die Substratstammlösung mit Alkohol hergestellt, was bei Estern der Fettsäuren C_2 bis C_5 ohne weiteres möglich ist, ist das Substrat gebrauchsfertig. Wurde jedoch Aceton als Lösungsmittel verwendet, muß das Substrat vorher bei Zimmertemperatur unter Anwendung einer dünnen Kapillare 20 Minuten bei etwa 1 mm Quecksilber evakuiert werden. 10 ml dieses Substrates enthalten 20 μMol Ester. Substrate mit Estern niedriger Fettsäuren sind bei Zimmertemperatur 2 bis 3 Stunden haltbar, β-Naphthylester mit höheren Fettsäuren enthaltende Substrate bleiben 2 bis 3 Tage unverändert. Aus Sicherheitsgründen sind sie jedoch täglich frisch zu bereiten.

Biologisches Material: Serum wird mit 0,9%iger Kochsalzlösung so verdünnt, daß 5 ml eine ausreichende Aktivität liefern. Organteile und sonstiges biologisches Material wird zusammen mit 0,9%iger Kochsalzlösung im Mixer homogenisiert. Die Verdünnung soll stets so gewählt werden, daß für die Bestimmung 5 ml eingesetzt werden können, ohne daß in der gewählten Bebrütungszeit mehr als ein Fünftel des vorgelegten Esters gespalten wird.

Trichloressigsäure: 50 g Trichloressigsäure (Riedel-de Haën) werden in einem 100-ml-Meßkolben in zirka 50 ml Wasser gelöst und nach Zusatz von Phenolphthalein mit 32%iger NaOH unter Kühlung genau neutralisiert (eine schwache Rosafärbung wird durch 1 Tropfen konz. Salzsäure zum Verschwinden gebracht) und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Die Lösung soll p_H 6 bis p_H 8 haben (Prüfung durch Universalindikatorpapier von Merck).

Na_2SO_4: p. A., wasserfrei, wird als Pulver verwendet.

7. Allgemeine Arbeitsweise zur Bestimmung der Aktivität β-Naphthylester spaltender Fermente in biologischem Material

Pro Analyse werden vier Meßkolben zu 100 ml benötigt und wie folgt beschriftet: V, M_1, M_2 und 0. Die Reihenfolge der Reagenszugabe sowie der Analysengang sind aus der in Tabelle 8 dargestellten schematischen Arbeitsweise ersichtlich.

Die Meßkolben werden gut verschlossen, von Hand kräftig durchgeschüttelt, die organische Phase in Zentrifugenröhrchen abgegossen, eine Spatelspitze Natriumsulfat zugesetzt, durchgeschüttelt und 10 Minuten bei 3000 U/min im verschlossenen Röhrchen zentrifugiert. Anschließend wird bei 465 nm mit einer Schichtdicke von 5 mm gegen 0 als Leerwert photometriert.

Liegen die Extinktionen höher als 0,900, werden je 2 ml der organischen Phase in einen 20-ml-Meßkolben pipettiert (Vollpipette!) und mit Extraktionsmittel zur Marke aufgefüllt. Nach gutem Durchmischen wird wie oben angegeben gemessen.

Tabelle 8. Schematische Darstellung der Arbeitsweise

	V	M_1	M_2	0
0,9%ige Kochsalzlösung (ml)	5	—	—	—
Biologisches Material (ml)	—	5	5	—
Substrat (ml)	10	10	10	—
Bebrütung bei 37°	+	+	+	—
Trichloressigsäure (ml)	5	5	5	5
Biologisches Material (ml)	5	—	—	—
Diazoniumlösung (ml)	5	5	5	5
$NaHCO_3$-Lösung (ml)	10	10	10	10
20 Minuten Zimmertemperatur	+	+	+	+
Extraktionsmittel (ml)	25	25	25	25

Berechnung

Die Menge des durch fermentative Spaltung entstandenen β-Naphthols kann direkt aus der Extinktion berechnet werden. Das Resultat (Aktivität) wird in μMol gespaltenem Ester angegeben, wobei stets die Zeit der Bebrütung und die Konzentration des eingesetzten biologischen Materials mit angegeben werden muß. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\left(\frac{\text{Ext.}_{M_1} + \text{Ext.}_{M_2}}{2} - \text{Ext.}_V\right) \cdot 4 = \mu\text{Mol gespaltener Ester.}$$

Wurde die Meßlösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, beträgt der Faktor 40,0.

8. Allgemeine Arbeitsweise zur quantitativen Bestimmung der Wirkung verschiedener zugesetzter Substanzen auf die Aktivität β-Naphthylester spaltender „A"-Esterasen in biologischem Material

Auf die Bedeutung der Bestimmung der Wirkung zugesetzter Substanzen zur Charakterisierung von Fermenten wurde bereits früher hingewiesen (z. B. *W. Pilz*[9]).

Die zu prüfende Substanz (mit hemmender oder aktivierender Wirkung, in der Literatur meist als „Hemmstoff" oder „Aktivator" bezeichnet) muß so in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst oder emulgiert werden, daß die zu untersuchende Menge in 5 ml dieser Lösung bzw. Emulsion enthalten ist. Im übrigen werden die in Abschnitt 6 beschriebenen Reagenzien und Lösungen verwendet.

Aus methodischen Gründen ist es vorteilhaft, in einer Analysenserie (vgl. Tabelle 9) die Wirkung zweier verschiedener Substanzen oder zweier verschiedener Konzentrationen einer Substanz auf die „A"-Esterase zu untersuchen. Die Arbeitsweise ist in Tabelle 9 schematisch dargestellt (für jede Bestimmungsserie werden 13 Meßkolben zu 100 ml benötigt, deren Bezeichnung, Reihenfolge der Reagenszugabe usw. aus der Tabelle hervorgeht):

Tabelle 9. Schematische Darstellung der Arbeitsweise zur Bestimmung der Wirkung zugesetzter Substanzen

	0	V_1	M_{1a}	M_{1b}	V_2	M_{2a}	M_{2b}	V_3	M_{3a}	M_{3b}	V_4	M_{4a}	M_{4b}
Stofflösung x (ml)	—	—	—	—	5	5	5	—	—	—	—	—	—
Stofflösung y (ml)	—	—	—	—	—	—	—	5	5	5	—	—	—
0,9%ige Kochsalzlösung (ml)	—	10	5	5	5	—	—	5	—	—	10	5	5
Biologisches Material (ml).	—	—	5	5	—	5	5	—	5	5	—	5	5
20 Min. Zimmertemperatur	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Substrat (ml)	—	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Bebrütung bei 37°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trichloressigsäure (ml) ...	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Biologisches Material (ml).	—	5	—	—	5	—	—	5	—	—	5	—	—
Diazoniumlösung (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
$NaHCO_3$-Lösung (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20 Min. Zimmertemperatur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extraktionsmittel (ml) ...	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Die Meßkolben werden gut verschlossen, von Hand kräftig durchgeschüttelt, die organische Phase in Zentrifugenröhrchen abgegossen, eine Spatelspitze Natriumsulfat zugesetzt, gut durchgeschüttelt und 10 Minuten bei 3000 U/min im verschlossenen Röhrchen zentrifugiert. Anschließend wird mit 5 mm Schichtdicke bei 465 nm gegen 0 als Leerwert photometriert.

Liegen die Extinktionen höher als 0,900, wird wie oben angegeben im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und dann gemessen.

Berechnung

Die hemmende oder aktivierende Wirkung der zugesetzten Stoffe wird bei Angabe der Stoffmenge (aus der Einwaage), der Konzentration des biologischen Materials und der Art des Substrates in Prozent angegeben, bezogen auf die Normalspaltung, die 100% gleichgesetzt wird. Die Normalspaltung erhält man aus den Ansätzen, in denen die Aktivität des Fermentes nicht durch Zusatz irgendwelcher Substanzen beeinflußt worden ist (diese Ansätze enthalten an Stelle der auf ihre Wirkung zu untersuchenden Substanz 0,9%ige Kochsalzlösung).

Zunächst wird die Aktivität der einzelnen Ansätze wie in Abschnitt 7 ausgeführt errechnet:

$$\left(\frac{\text{Ext.}_{M_{1a}} + \text{Ext.}_{M_{1b}}}{2} - \text{Ext.}_{V_1}\right) \cdot 4 = C \qquad (\mu\text{Mol}),$$

$$\left(\frac{\text{Ext.}_{M_{2a}} + \text{Ext.}_{M_{2b}}}{2} - \text{Ext.}_{V_2}\right) \cdot 4 = H(x) \quad (\mu\text{Mol}),$$

$$\left(\frac{\text{Ext.}_{M_{3a}} + \text{Ext.}_{M_{3b}}}{2} - \text{Ext.}_{V_3}\right) \cdot 4 = H(y) \quad (\mu\text{Mol}),$$

$$\left(\frac{\text{Ext.}_{M_{4a}} + \text{Ext.}_{M_{4b}}}{2} - \text{Ext.}_{V_4}\right) \cdot 4 = D \qquad (\mu\text{Mol}).$$

C und D geben die Normalspaltung an, die auch die Ansätze $H(x)$ und $H(y)$ ergeben hätten, wenn ihnen keine die Fermentaktivität beeinflussenden Substanzen zugesetzt worden wären. Aus Sicherheitsgründen bestimmt man das Mittel aus C und D und setzt es 100% gleich:

$$\frac{C\ (\mu\text{Mol}) + D\ (\mu\text{Mol})}{2} = E\ (\mu\text{Mol}) = 100\%.$$

C und D dürfen nicht mehr als $\pm$ 3% (absolut) voneinander abweichen; ist diese Bedingung nicht erfüllt, ist die Serie zu verwerfen.

Aus den obigen Werten errechnet man die Wirkung der zugesetzten Substanzen wie folgt:

$$\frac{H(x)\ (\mu\text{Mol}) \cdot 100}{E\ (\mu\text{Mol})} = \%\ \text{Wirkung der Substanz } x,$$

$$\frac{H(y)\ (\mu\text{Mol}) \cdot 100}{E\ (\mu\text{Mol})} = \%\ \text{Wirkung der Substanz } y.$$

Wirkungswerte über 100% bedeuten eine Aktivierung, solche unter 100% eine Hemmung des Fermentes; werden dagegen 100% gefunden, ist keine Beeinflussung durch die zugesetzte Substanz eingetreten. Da sowohl Substanzeinwaage als auch Fermentmenge und Substrat bekannt sind, handelt es sich um eine quantitative Bestimmung der Wirkung, bezogen auf die Normalspaltung.

Wie umfangreiche Untersuchungen ergeben haben, reicht die Zeit von 20 Minuten, in der die Fermentlösung mit der Substanzlösung bei Zimmertemperatur steht, bei weitem zur Einstellung des entsprechenden Gleichgewichtes aus.

9. Beleganalysen

a) Aktivitätsbestimmung im menschlichen Serum:

Serum A (0,05 ml eingesetzt, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Essigsäure-β-Naphthylester vorgelegt):

Aktivität gef.: 3,22, 3,19, 3,25, 3,20 μMol.

Serum B (0,05 ml eingesetzt, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Essigsäure-β-Naphthylester vorgelegt):
Aktivität gef.: 5,85, 5,85, 5,82, 5,86 μMol.

Serum C (0,05 ml eingesetzt, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Propionsäure-β-Naphthylester vorgelegt):
Aktivität gef.: 10,76, 10,72, 10,74, 10,76 μMol.

Serum C (0,05 ml eingesetzt, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Buttersäure-β-Naphthylester vorgelegt):
Aktivität gef.: 2,32, 2,32, 2,28, 2,30 μMol.

b) Wirkung zugesetzter Substanzen auf die Aktivität biologischen Materials:

Menschenleber (32 g auf 5000 ml, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Propionsäure-β-Naphthylester vorgelegt, Hemmstoff: 5 mg Atoxyl):
Wirkung gef.: 44,1, 43,8, 44,4, 44,2%.

Menschenleber (32 g auf 5000 ml, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Propionsäure-β-Naphthylester vorgelegt, Hemmstoff: 5 mg Protamin):
Wirkung gef.: 72,6, 72,2, 72,7, 72,3%.

Serum D (0,05 ml eingesetzt, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Essigsäure-β-Naphthylester vorgelegt, Hemmstoff: 50 μg Prostigmin):
Wirkung gef.: 88,5, 88,2, 88,8, 88,6%.

Serum E (0,05 ml eingesetzt, Bebrütung 30 Minuten bei 37°, 20 μMol Essigsäure-β-Naphthylester vorgelegt, Hemmstoff: 5 mg KCN):
Wirkung gef.: 104,5, 104,2, 104,2, 104,5%.

Zusammenfassung

Es wird eine exakte Methode zur Bestimmung von β-Naphthol-Fettsäure-Ester spaltenden Fermenten in beliebigem biologischen Material dargestellt. Sie basiert auf einer Bestimmung von freiem β-Naphthol in Gegenwart eines großen Überschusses von Emulsionen von β-Naphthylestern. Die bisher dazu erschienene Literatur wird im Hinblick auf die Methodik kritisch gesichtet und nachgewiesen, daß mit einer Ausnahme in allen bisher bekanntgewordenen Arbeiten mindestens vier prinzipielle Fehlerquellen enthalten sind: Methodische Fehler bei der photometrischen Analyse, Gehalt der Substrate an stark hemmenden organischen Lösungsmitteln, Außerachtlassung der Teilchengröße und starke Instabilität der verwendeten Substrate aus Mangel an Schutzkolloiden und Stabilisatoren (Zerfall der Substrate während der Bebrütung). Alle aufgefundenen Fehler werden in der hier vorliegenden Methode vermieden. Außerdem

wird die quantitative Bestimmung der Wirkung zugesetzter Substanzen auf die Aktivität der β-Naphthylester spaltenden aromatischen Esterasen beschrieben. Diese Wirkung wird in Prozent der stets mitbestimmten Normalspaltung, die 100% gleichgesetzt wird, angegeben. Die Methode ist allgemein gehalten, sie kann zur Untersuchung beliebiger Fermente, die Fettsäureester des β-Naphthols spalten, verwendet werden und je nach den Erfordernissen im Hinblick auf p_H-Wert, Art des verwendeten β-Naphthylesters, Konzentration des Substrates usw. sofort den geforderten Gegebenheiten angepaßt werden.

Summary

A precise method is presented for the determination of ferments which cleave β-naphthol-fatty acid-esters in any selected biological material. It is based on a determination of free β-naphthol in the presence of a large excess of emulsions of β-naphthyl esters. The previous pertinent literature was critically reviewed from the standpoint of methodology and it is found that with one exception all of the published methods contain at least four fundamental sources of error: methodical errors in the photometric analysis, content of strongly inhibiting organic solvents in the substrate, neglect of the particle size and pronounced instability of the substrates to be used due to lack of protective colloids and stabilizers (decomposition of the substrates during the incubation). All of the detected errors are avoided in the present method. Furthermore, a description is given of the quantitative determination of the action of added substances on the activity of the esterases splitting the β-naphthyl esters. This action is reported in percent of the normal splitting which is always also determined and which is taken as 100%. The method is kept in general terms, it may be employed for the study of any ferments whatsoever which split the fatty acid esters of β-naphthol, and it can be immediately adapted to meet the given circumstances, such as the requirements with regard to the p_H value, the kind of β-naphthyl ester employed, concentration of the substrate, etc.

Résumé

On décrit une méthode exacte pour doser les ferments qui permettent de séparer les esters d'acides gras du β-naphtol dans une substance biologique quelconque. Elle est fondée sur un dosage du β-naphtol libre en présence d'un gros excès d'émulsions d'esters β-naphtyliques. On a examiné d'un esprit critique du point de vue de la méthode, la littérature publiée jusqu'à maintenant sur ce sujet et l'on montre qu'il y a dans tous les travaux connus jusqu'ici, à l'exception d'un seul, quatre sources principales d'erreurs: les erreurs dues à la méthode même, pour l'analyse photométrique, la teneur des substrats en solvants organiques qui empêchent fortement le déroulement d'un procédé chimique, le fait que l'on ne se préoccupe pas de la taille des particules et une forte instabilité des substrats utilisés, due à l'absence de colloïdes protecteurs et de stabilisateurs (décomposition des substrats pendant l'incubation). Dans la méthode présentée, on élimine toutes les erreurs trouvées. De plus, on décrit la détermination quantitative de l'action des substances ajoutées, sur l'activité des estérases aromatiques qui séparent les esters naphtyliques. On donne cette action en pour cent de la séparation normale

toujours déterminée en même temps, que l'on pose égale à 100%. C'est une méthode générale; elle peut être utilisée pour la recherche de ferments quelconques qui séparent les esters des acides gras du β-naphtol et qui peuvent être adaptés tout de suite aux données exigées, en tenant compte de la valeur du p_H, de la catégorie de l'ester β-naphtylique utilisé, de la concentration du substrat, etc.

Literatur

[1] *M. M. Nachlas* und *A. M. Seligman*, J. Nat. Cancer Inst. **9**, 415 (1949).
[2] *C. B. Augustinsson*, Nature (London) **181**, 1786 (1958).
[3] *M. M. Nachlas* und *A. M. Seligman*, J. Biol. Chem. **181**, 343 (1949).
[4] *A. M. Seligman, M. M. Nachlas* und *M. C. Mollomo*, Amer. J. Physiol. **159**, 337 (1949).
[5] *A. M. Seligman* und *M. M. Nachlas*, J. Clin. Investigation **29**, 31 (1950).
[6] *H. A. Ravin* und *A. M. Seligman*, Arch. Biochemistry **42**, 337 (1953).
[7] *S. Katz*, Amer. J. Gastroenterol. **27**, 479 (1957).
[8] *A. A. Delcourt, C. E. Rubin, W. L. Palmer* und *J. B. Kirschner*, J. Lab. Clin. Med. **42**, 310 (1959).
[9] *W. Pilz*, Z. ges. exper. Med. **132**, 310 (1959).
[10] *L. Michaelis*, J. Biol. Chem. **87**, 33 (1930).
[11] *W. Pilz*, Z. ges. exper. Med. (im Druck).

Aus dem Forschungslaboratorium der Chemisch-pharmazeutischen Fabrik Adolf Klinge & Co., München 23

Trennung und Bestimmung von Oestron, 17 β-Oestradiol und 16 α, 17 β-Oestriol mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Von

Hansjürgen Struck

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 7. April 1961)

In der Literatur sind mehrere Arten der Oestrogenbestimmung beschrieben, biologische[1–6], spektralphotometrische[7–9], fluorimetrische[10–23], kolorimetrische[24–40], durch radioaktive Markierung[42,43], enzymatische[44–46] und chromatographische[47–51]. In einigen Arbeiten werden die verschiedenen Methoden verglichen und zum Teil recht gute Übereinstimmungen festgestellt[52–59].

Auf die Bestimmungsarten im einzelnen einzugehen, würde hier zu weit führen, es sollen nur einige allgemeine Gesichtspunkte herausgegriffen werden. Die biologischen Methoden sind sehr empfindlich, verlangen aber großen Zeitaufwand, viel Tiermaterial und sind recht erheblichen Schwankungen unterworfen. Die spektralphotometrischen Bestimmungen sind einfach durchzuführen, doch ist die Empfindlichkeit recht gering. Die Fluorimetrie ist unspezifisch, da alle fluoreszierenden Substanzen erfaßt werden. Zu ihrer Anwendung ist es notwendig, die Oestrogene rein darzustellen, was viel Zeit kostet und zu Verlusten führt. Die kolorimetrischen Verfahren werden am meisten verwendet, vor allem die Kober-Reaktion, die von *Brown*[30] sehr ausführlich beschrieben wurde. Bei der Anwendung der Koberschen Reaktion müssen unspezifische Chromogene ausgeschaltet werden, was auf Kosten der Genauigkeit geht. Die Bestimmung der Oestrogene durch Isotopenverdünnung ist genau — und auch kurzfristig durchführbar, verlangt aber einen erheblichen apparativen Aufwand. Die säulenchromatographischen Bestimmungen sind nur mit größeren Hormonmengen durchführbar.

Nach der von uns durchgeführten papierchromatographischen Trennung der Oestrogene[60] suchten wir nach einer einfachen, möglichst

genauen und zeitlich schnell durchführbaren Bestimmungsmethode. Nach längeren Versuchsreihen mit den verschiedensten acetylierten Papieren (Firma Schleicher & Schüll und Firma Macherey & Nagel) kamen wir zu der Erkenntnis, daß diese Papiere zu hohen Schwankungen unterworfen sind und daher für quantitative Bestimmungen, bei der von uns geforderten Genauigkeit, ungeeignet sind. Wir wandten uns aus diesem Grunde der Dünnschichtchromatographie nach *E. Stahl*[61] zu.

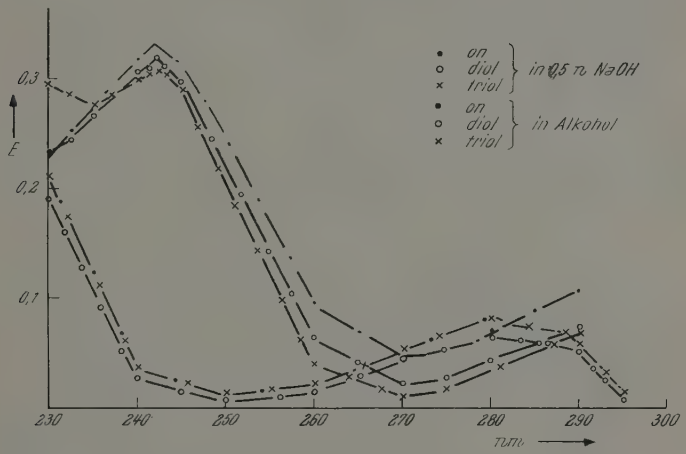


Abb. 1. Vergleich der Absorption der Oestrogene in Äthanol und 0,5-n alkoholischer Natronlauge

Bei früheren Versuchen hatten wir nun gefunden, daß sich das Maximum der Oestrogene in alkoholischer Natronlauge in das kurzwellige U. V.-Gebiet verschiebt (von 281 nm nach 242 nm), was wahrscheinlich durch das Vorliegen in Salzform als Phenolate verursacht ist. Mit Phenol ist eine ebensolche Maximumverschiebung zu beobachten. Von Bedeutung war dabei für uns, daß sich bei dieser Änderung des Maximums gleichzeitig eine erhebliche Extinktionszunahme ergab, wie aus Abb. 1 zu sehen ist.

Auf Grund dieses Befundes entwickelten wir nun eine Bestimmungsmethode der Oestrogene, die im folgenden näher beschrieben werden soll: Zur Trennung der Oestrogene benutzten wir die Dünnschichtchromatographie. Mit Kieselgel als Adsorbens und Benzol/Äthanol (9 : 1) als Laufmittel ergaben sich folgende R_f-Werte:

Oestron	0,51 ± 0,04
Oestradiol	0,30 ± 0,03
Oestriol	0,11 ± 0,02

Nach der Anfärbung mit Antimonpentachlorid lassen sich noch 0,25 μg der Einzelkomponenten nachweisen.

Für die quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen gibt es noch verhältnismäßig wenig Anhaltspunkte in der Literatur. *H. Gänshirt* und *K. Morianz*[62] befaßten sich mit der Bestimmung von p-Hydroxybenzoesäuremethylester- und p-Hydroxybenzoesäurepropylester-Gemischen, *F. W. Hefendahl*[63] mit der Bestimmung des Menthofuran in ätherischen Ölen und *F. Schlemmer* und *E. Link*[64] mit der Bestimmung des Reserpins. Wir haben nun Bedingungen ausgearbeitet, nach denen es möglich ist, auch solche Substanzen zu bestimmen, die erst durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Nach der Trennung der Oestrogene werden diese mit 0,5-n Natronlauge in 80%igem Äthanol eluiert und bei 242 nm im Spektralphotometer gegen die entsprechenden Kieselgelblindwerte gemessen. An Hand der jeweiligen Eichkurven können die gefundenen Oestrogenwerte abgelesen werden.

In der Tabelle 1 sind die gefundenen Werte angeführt.

Tabelle 1. Wiedergefundene Mengen an Oestron, 17 β-Oestradiol und Oestriol. 5 μg aufgetragen

Platten-Nr.	Oestron		17 β-Oestradiol		Oestriol	
	Blindw. 1	Blindw. 2	Blindw. 1	Blindw. 2	Blindw. 1	Blindw. 2
100	4,6	4,8	4,9	5,2	4,6	4,6
101	4,6	4,8	5,2	5,2	5,8	6,3
102	5,7	5,7	5,2	5,2	5,7	5,7
103	4,8	5,1	5,0	5,0	4,9	5,5
104	4,5	5,1	5,1	5,1	4,8	5,1
105	4,5	5,1	4,5	4,5	5,1	5,4
106	5,1	5,1	—	—	—	—
107	—	—	5,7	5,7	6,3	6,3
108	—	—	4,4	4,4	4,9	5,2
109	4,5	4,5	4,7	4,7	4,6	5,2
110	4,2	4,8	4,4	5,0	5,5	5,5
111	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,9
112	5,4	5,7	5,0	5,3	5,0	5,0
113	4,9	4,9	4,8	4,8	6,1	6,1
114	4,3	4,3	4,3	5,0	4,7	5,0
115	3,8	4,3	4,2	4,8	4,4	5,0

Die Tabelle 2 enthält die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Experimenteller Teil

Es wurde die Ausrüstung und Anweisung für die Dünnschichtchromatographie nach *E. Stahl* benutzt*. Als Adsorbens wurde Kieselgel G

* Hersteller: Firma Desaga, Heidelberg.

Tabelle 2. Standardabweichungen von Oestron, 17 β-Oestradiol und Oestriol. Menge 5 μg/3 ml = 1,67 μg/ml

	Oestron	17 β-Oestradiol	Oestriol
Anzahl der Bestimmungen	14	15	15
Anzahl der Werte n^*	22	20	23
Mittelwert $\bar{x}$	4,9	4,9	5,2
Standardabweichung			
$S = \sqrt{\frac{\Sigma (x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$	± 0,49	± 0,38	± 0,53
$S_{rel.} = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}}$	± 10,0%	± 7,9%	± 10,1%
$S_{rel.}$ für $\bar{x} = 5{,}0$	± 10,2%	± 8%	± 12,6%

* Sind die gemessenen zwei Blindwerte verschieden, so wird mit jedem Blindwert getrennt der Meßwert bestimmt.

(Firma Merck, Darmstadt) verwendet. Vor dem Ausstreichen der Platten werden 30 g Kieselgel mit Methanol p. a. überschichtet und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am nächsten Morgen wird abfiltriert, zweimal mit zirka 10 ml frischem Methanol nachgewaschen und eine $^1/_2$ Stunde bei 100° getrocknet. Mit diesem vorgereinigten Kieselgel werden anschließend die Platten bestrichen. Zur quantitativen Auswertung der Platten werden diese in fünf Streifen aufgeteilt (Befreien der Glasplatten vom Adsorbens mit Hilfe eines 5 mm breiten Spatels) und in bestimmtem Schema, wie aus der Abb. 2 ersichtlich, die Substanzen aufgetragen.

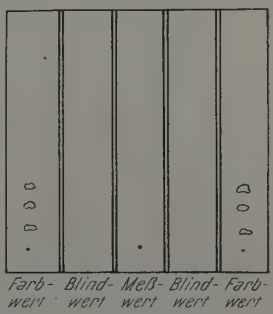


Abb. 2. Schema einer Platte zur quantitativen Auswertung

Es werden alkoholische Lösungen von Oestron, 17 β-Oestradiol und Oestriol von 1 mg/ml hergestellt und davon 0,005 ml = 5 μg aufgetragen. (Die Lösungen werden in Schliffgefäßen im Eisschrank bei 0° aufbewahrt.) Um einen gleichmäßigen Lauf über die gesamte Breite der Platte zu gewährleisten, wird der Entwicklungstrog mit einer Wasserwaage austariert und eine Glasplatte auf den Boden der Kammer gelegt, um den stets gewölbten Boden auszugleichen. Wir arbeiten mit der übersättigten Kammer und benutzen als Laufmittel Benzol/Äthanol (9 : 1) (puriss. u. pur.). Beide Lösungsmittel werden vor dem Gebrauch nochmals

destilliert. Die Laufzeit beträgt bei einer Strecke von 10 cm zirka 25 Minuten. Anschließend werden die Platten $^1/_2$ Stunde bei 100° getrocknet.

Anfärbung

Farblösung: Antimonpentachlorid (wasserfrei, Riedel de Haen, 12%) in Tetrachlorkohlenstoff (pur. Erg. B 6).

1. Qualitativ: Zum Nachweis der Oestrogene genügt es, die Platten mit dem Reagens zirka 1 Minute intensiv zu besprühen und es erscheinen Oestron als dunkelbrauner, 17 β-Oestradiol als hellbrauner und Oestriol als rotvioletter Fleck (die Farbreaktion tritt ohne Erhitzen ein).

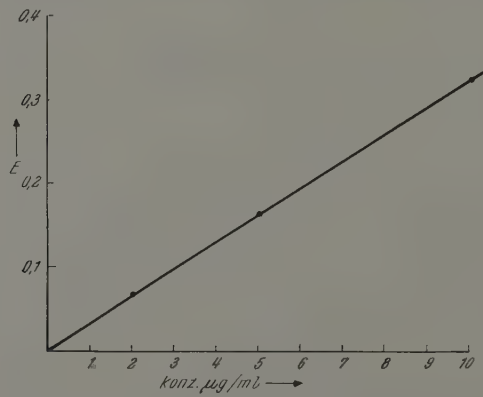


Abb. 3. Eichkurve für Oestron mit 0,5-n alkoholischer NaOH

2. Quantitativ: Bei der quantitativen Auswertung läßt sich nicht vermeiden, daß die aufgesprühte Färbelösung in den mittleren, mit Plexiglas abgedeckten Teil der Platte hineinwandert. Wir verwenden daher eine Art Stempelverfahren. Der innere Teil der Platte wird mit einer Plexiglasschablone abgedeckt und die beiden äußeren Streifen mit Aqua dest. besprüht. Anschließend wird ein gewöhnlicher Holzlöscher (es empfiehlt sich, das Holz vor der Färbelösung z. B. mit Cellophan zu schützen), der mit gut saugendem Lösch- oder Filterpapier bedeckt ist, in die Farblösung getaucht und dieser auf den äußeren Bahnen zweimal abgerollt (nach jedem Abrollen muß er von neuem in die Farblösung getaucht werden), so daß diese mit der Farblösung gut durchfeuchtet sind. Anschließend werden die Platten 8 bis 10 Minuten bei 100° gehalten, wobei sich die Farbkomplexe bilden.

Extraktion

Analog den angefärbten Bahnen werden auf den drei inneren Streifen mit einem Skalpell (dieses ist vorteilhafter als eine Rasierklinge) Recht-

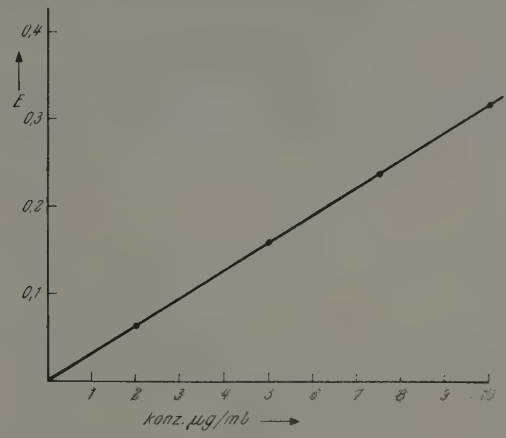


Abb. 4. Eichkurve für Oestradiol mit 0,5-n alkoholischer NaOH

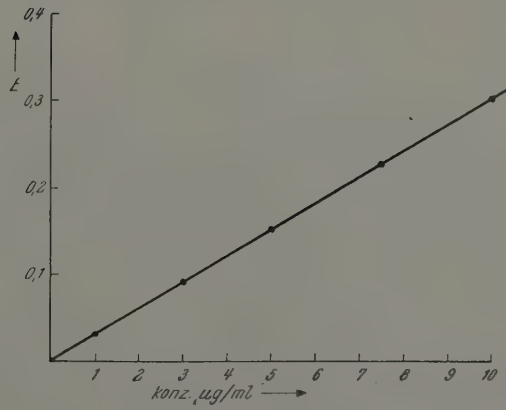


Abb. 5. Eichkurve für Oestriol in 0,5-n alkoholischer NaOH

ecke markiert und dann das Kieselgel innerhalb der Markierungen mit dem Skalpell sorgfältig abgekratzt und in Zentrifugengläschen übergeführt. Das Kieselgel wird $^1/_2$ Stunde mit einer jeweils frisch hergestellten 0,5-n Natronlauge in 80%igem Äthanol (3 ml, Benutzung einer

geeichten Vollpipette) extrahiert. Die Röhrchen werden mit Korkstopfen, die in Aluminiumfolien eingewickelt sind, verschlossen. Anschließend werden die Gläschen — verschlossen und unter Eiskühlung — bei 3000 U/min 4 Minuten lang zentrifugiert und die klare Lösung dekantiert.

Messung

Im Spektralphotometer (Zeiss-Spektralphotometer, Empfindlichkeitsstufe 8, Schichtdicke 10 mm) werden bei 242 nm sowohl die zwei Blindwerte als auch die entsprechenden Oestrogenwerte gegen 0,5-n alkoholische

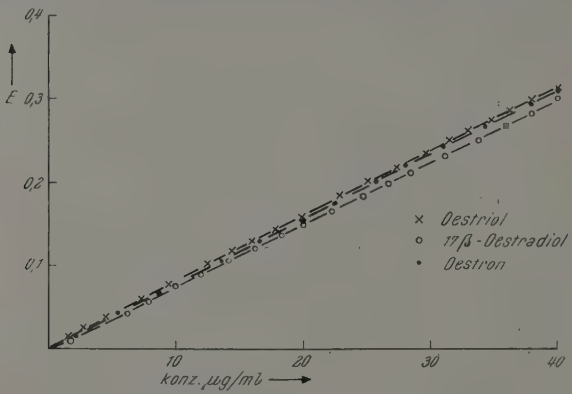


Abb. 6. Eichkurven für Oestron, 17 β-Oestradiol und Oestriol in absolutem Äthanol

Natronlauge gemessen. Bei den Blindwerten ergeben sich Extinktionen von 0,015 bis 0,005. Die Blindwerte werden von den Meßwerten abgezogen und die so ermittelte Extinktion (bei unterschiedlichen Blindwerten werden zwei Meßwerte erhalten) ergibt nach dem Ablesen aus der Eichkurve die Anzahl µg/ml.

Faktorbestimmung

Da trotz des Aufbewahrens der Stammlösungen in Schliffgefäßen bei 0° C Alkoholverluste auftreten, muß der wahre Gehalt der Lösungen (1 mg/ml) jeden Tag auf folgende Art bestimmt werden:

1 ml der Lösung wird in einem geeichten 50-ml-Meßkolben mit Äthanol pur. destilliert bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird bei 281 nm gegen reines Äthanol gemessen und der genaue Wert einer Eichkurve entnommen. Der Sollwert (20 µg/ml) wird durch den gefundenen Wert dividiert und ergibt so den jeweiligen Faktor, mit dem das Meßergebnis noch multipliziert werden muß.

Diskussion

Wie schon *Gänshirt* und *Morianz*[62] gefunden haben, läßt sich die U. V.-Absorption des Kieselgels auch bei der von uns benutzten Wellenlänge durch vorheriges Waschen mit Methanol praktisch auf Null reduzieren. Die günstigste Extraktionszeit mit 0,5-n Natronlauge wurde in mehreren Versuchsreihen an ungelaufenen Platten untersucht und, wie im experimentellen Teil angegeben, mit $^1/_2$ Stunde als ausreichend gefunden. Die Wiedergewinnung betrug 100%. Als Lösungsmittel für die Natronlauge wurde 80%iges Äthanol benutzt, da bei absolutem Äthanol Trübungen auftraten. Ebenso konnte keine stärkere Natronlauge verwendet werden, da sich sonst in Verbindung mit dem Kieselgel getrübte Lösungen ergaben.

Durch Anwendung einer Mikrometerspritze wäre es sicher möglich, die Fehlergrenze der Methode weiter zu verringern. Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit der Methode ist noch durch Anwendung von Mikroküvetten bei spektralphotometrischer Messung gegeben, da im qualitativen Test noch 0,25 μg der Einzelkomponenten zu erkennen sind. Über die Anwendung der Methode in biologischen Medien berichten wir später.

Frl. *Brigitte Neumann* danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung von Vorversuchen.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wird die Trennung von Oestron, 17 β-Oestradiol und Oestriol erzielt. Weiter ist es möglich, mit 0,5-n alkoholischer Natronlauge (80%) und Messung der Extinktion bei 242 nm noch 1,67 μg/ml der Einzelkomponenten mit einer Genauigkeit von zirka ± 10% zu bestimmen.

Summary

Oestrone (estrone), 17 β-oestradiol, and oestriol can be separated by thin layer chromatography. It is also possible to determine as little as 1.67 μg/ml of the individual components with an accuracy of around ± 10% by means of 0.5 *N* alcoholic (80%) sodium hydroxide and measurement of the extinction at 242 nm.

Résumé

On a effectué la séparation de l'oestrone, de l'oestradiol 17 β et de l'oestriol, par chromatographie en couche mince. On peut alors doser par la lessive de soude alcoolique 0,5 *N* (80%) et faire la mesure de l'absorption à 242 nm, jusqu'à 1,67 μg/ml de chacun des constituants avec une précision d'environ ± 10%.

Literatur

[1] *R. D. Bulbrock*, J. Endocrinology **15**, 206 (1957).
[2] *J. K. Donahue*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **69**, 179 (1948).
[3] *P. J. Claringbold* und *L. Martin*, Nature **181**, 620 (1958).
[4] *J. F. Miquel*, *E. H. Barany* und *W. Müller*, Arch. int. pharmacodyn. thérap. **117**, 262 (1958).
[5] *B. M. Schofield*, J. Physiol. **135**, 2 (1957).
[6] *Th. L. Dao*, Endocrinology **61**, 242 (1957).
[7] *R. W. Bates*, Rec. Progr. Hormon Res. **9**, 95 (1954).
[8] *A. J. Haagen-Smit*, J. Biol. Chem. **174**, 523 (1948).
[9] *H. B. Friedgood* und *J. B. Carst*, Rec. Progr. Hormon Res. **2**, 31 (1948).
[10] *E. H. Aitken* und *J. R. K. Preedy*, J. Endocrinology **9**, 251 (1953).
[11] *E. H. Aitken* und *J. R. K. Preedy*, Biochem. J. **62**, 15 P (1956).
[12] *W. R. Eberlein*, *A. M. Bongiovanni* und *C. M. Francis*, J. Clin. Endocrinology **18**, 1274 (1958).
[13] *J. B. Garst*, *J. F. Nyc*, *D. Maron* und *H. B. Friedgood*, J. Biol. Chem. **186**, 119 (1950).
[14] *T. Nakao* und *Y. Aizawa*, Endocrinol. Jap. **3**, 92 (1956).
[15] *H. S. Strickler*, *R. C. Grauer* und *M. R. Caughey*, Analyt. Chemistry **28**, 1240 (1956).
[16] *J. Varangot*, *A. Seeman* und *L. Cédard*, Ann. endocrinol. **18**, 942 (1957).
[17] *A. Weeke*, Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. x **31**, 41 (1957).
[18] *J. Varangot*, *A. Seeman* und *L. Cédard*, Semaine hop. (pathol. biol.) Ann. rech. méd. **1957**, 19.
[19] *T. Nako* und *Y. Aizawa*, Endocrinol. Jap. **2**, 13 (1955).
[20] *W. R. Slaunwhite*, *L. L. Engel*, *P. C. Olmstedt* und *P. Carter*, J. Biol. Chem. **191**, 627 (1951).
[21] *L. Bosch*, Acta Physiol. **5**, 104 (1956/57).
[22] *A. Puck*, Klin. Wschr. **33**, 865 (1955).
[23] *A. Puck*, Klin. Wschr. **35**, 808 (1957).
[24] *R. W. Bates* und *H. Cohen*, Endocrinology **47**, 166 (1950).
[25] *W. M. Allen*, Clin. Endocrin. **10**, 71 (1950).
[26] *K. Andrec* und *M. Krec*, Bull. sci. Yougoslav. **2**, 103 (1956).
[27] *F. Baum*, *E. Krekeler* und *J. Stengele*, Klin. Wschr. **35**, 85 (1957).
[28] *H. Braunsberg*, Acta Endocrinol. (Copenhagen) **26**, 443 (1957).
[29] *H. Breuer*, *W. Nocke*, *G. Geissler* und *F. L. Mitchell*, Klin. Wschr. **35**, 672 (1957).
[30] *J. B. Brown*, Biochemic. J. **60**, 185, 193 (1955).
[31] *E. Diszfalusy*, Acta Endocrinol. (Copenhagen) **24**, Suppl. **31**, 11 (1957).
[32] *E. Diszfalusy* und *P. Lindkvist*, Acta Endocrinol. (Copenhagen) **22**, 203 (1956).
[33] *G. Haldberg*, Klin. Wschr. **14**, 742 (1957).
[34] *W. Pschyrembel* und *G. E. Halder*, Z. physiol. Chem. **306**, 154 (1957); **310**, 281 (1958).
[35] *K. Söderström*, Farmac Notisbl. **65**, 61 (1956).
[36] *E. J. Umberger* und *J. M. Curtis*, J. Biol. Chem. **178**, 275 (1949).
[37] *J. Zieleniewska*, Endocrinol. polska **6**, 36 (1955).
[38] *G. Ittrich*, Z. physiol. Chem. **312**, 1 (1958).
[39] *W. S. Bauld*, Biochemic. J. **63**, 488 (1956).
[40] *J. B. Brown*, *R. D. Bulbrock* und *F. C. Greenwood*, J. Endocrinology **16**, 41, 49 (1957).

[41] *D. L. Berliner, O. V. Dominguez* und *G. Westenskow*, Analyt. Chemistry **29**, 1797 (1957).
[42] *D. C. Leegwater*, Ref.: Rona Ber. Biol. **191**, 6 (1957).
[43] *D. Aberson* und *Ph. K. Bondy*, Analyt. Chemistry **28**, 1922 (1956).
[44] *W. R. Slaunwhite* jr. und *A. A. Sandberg*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **101**, 544 (1959).
[45] *B. Hurlock* und *P. Talalay*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **93**, 560 (1956).
[46] *B. Hurlock* und *P. Talalay*, J. Biol. Chem. **227**, 37 (1957).
[47] *D. M. Loring* und *C. A. Villee*, Acta Endocrinol. (Copenhagen) **25**, 371 (1957).
[48] *F. J. Ritter* und *H. Hartel*, Nature **181**, 765 (1958).
[49] *H. Breuer*, Naturwiss. **16** (1955).
[50] *J. E. Bush*, Rec. Progr. Hormon Res. **9**, 321 (1954).
[51] *T. Seki*, Nature **181**, 768 (1958).
[52] *W. Wendland*, Klin. Wschr. **14**, 742 (1957).
[53] *L. R. Axelrod*, J. Biol. Chem. **201**, 59 (1953).
[54] *F. F. Gallagher, S. Kraichy, J. Fishman, J. B. Brown* und *G. F. Marrian*, J. Biol. Chem. **233**, 1093 (1958).
[55] *F. D. Humm, P. L. Munson* und *W. T. Salter*, Endocrinology **48**, 225 (1951).
[56] *F. F. Marrian*, Cancer **10**, 704 (1957).
[57] *W. Pschyrembel* und *G. E. Halder*, Z. physiol. Chem. **314**, 276 (1959).
[58] *W. Pschyrembel* und *G. E. Halder*, Z. ges. exper. Med. **131**, 139 (1959).
[59] *O. W. Smitz* und *N. N. Blackham*, Acta Endocrinol. (Copenhagen) **25**, 133 (1957).
[60] *J. Zander*, Geburtshilfe u. Frauenheilk. **15**, 151 (1955).
[61] *E. Moracci*, An. brasil. de ginec. **27**, 419 (1946).
[62] *H. Struck*, Naturwiss. **45**, 41 (1958).
[63] *E. Stahl*, Chem.-Ztg. **82**, 323 (1958).
[64] *H. Gänshirt* und *K. Morianz*, Arch. Pharmaz. **30**, 1065 (1960).
[65] *F. W. Hefendahl*, Planta med. **8**, 65 (1960).
[66] *F. Schlemmer* und *E. Link*, Pharmaz.-Ztg. **104**, 1349 (1959).

Faculty of Science, University of Lisbon, Portugal

Micro-Determination of Potassium with EDTA

By

A. de Sousa*

(Received March 15, 1961)

The gravimetric procedures for the determination of potassium are long and delicate. The potassium salts must be carefully dried and dehydrated before being weighed. These two operations require special care and many hours may be required before constant weight is attained. On the other hand, since potassium salts are much more volatile than the corresponding sodium salts, there is always a risk of partial volatilisation, especially when very small quantities are treated.

These difficulties[1] induced the author to use a volumetric method for the determination of potassium as potassium perchlorate[2]. The principle of the procedure is based on the transformation of the perchlorate into potassium chloride[3] and the precipitation of the chloride by silver nitrate. The EDTA titration method for the determination of halides[4] is then applied. The silver chloride precipitate is dissolved in an ammoniacal solution of potassium tetracyanonickelate. The following exchange reaction occurs in which two atoms of silver or chloride are equivalent to one atom of nickel; the nickel ion freed may be titrated to the murexide end point.

$$2\ AgCl + [Ni(CN_4)]^{-2} \rightarrow 2\ Ag(CN)_2^{-} + Ni^{2+} + 2\ Cl^{-}.$$

Reagents

Ammonium chloride (A. R.);
5% and 0.1% silver nitrate solutions;
0.001 *M* EDTA solution;
saturated water solution of murexide (make fresh each day);

* Present address: Rua Rodrigo da Fonseca 190-3 E, Lisbon I, Portugal.

$K_2Ni(CN)_4$ solution 0.1 *M* prepared by titrating 0.1 *M* $NiSO_4$ in 500 ml of water made ammoniacal with 1 *M* KCN until murexide changes from yellow to purple, and then diluting the solution to 1000 ml.

Procedure

Potassium is precipitated as the chlorate in a centrifuge tube. After centrifuging, the precipitate is dried rapidly by washing with ether, and is then introduced into a micro platinum dish. About 0.5 g of ammonium chloride is added to the perchlorate and both are mixed. The surface is covered with 0.5 g of ammonium chloride. A watch glass is placed on the dish and this is heated gently for 1 to 2 hours at a temperature below the fusion point of the residual chlorides (otherwise low results are obtained and the platinum will be attacked). After adding 0.5 g of ammonium chloride the dish is heated as before for half an hour. After cooling, the chloride is dissolved in 10 ml of distilled water in a beaker. Two drops of nitric acid are added and then, dropwise, 5% silver nitrate till all the chloride is precipitated. The beaker is heated to boiling, and is then put aside to cool. The cold contents are filtered on a micro Gooch filter. The precipitate is washed with 5 ml of 0.1% silver nitrate, and then with 2 to 3 ml of 1% nitric acid. The filter is introduced into a 50-ml beaker containing about 10 ml of the ammoniacal solution of potassium tetracyanonickelate. Stirring and cautious warming will aid in effecting solution[5]. As soon as solution is complete, dilute to about 20 ml, add two drops of murexide solution and titrate slowly with 0.001 *M* EDTA to a yellow-to-purple end point. Each ml of the solution corresponds to 0.0782 mg of potassium or to 0.0942 mg of potassium oxide.

Results and Remarks

Very satisfactory results were obtained in the analysis of pure potassium salts. The potassium was precipitated as perchlorate and then treated by the described procedure. The quantities of potassium analysed varied from 0.01 to 0.0001 g. The errors varied from $\pm$ 4% to 6% in the range of the above tests. The time for the EDTA determination was 3 to 4 hours (after precipitation of potassium perchlorate). The classical gravimetric determination took 2 to 3 hours more, and the errors observed varied from 6% to 9%.

Summary

A micro-determination method for potassium with EDTA is described. The perchlorate precipitate is reduced to chloride by heating the perchlorate with ammonium chloride, and the chloride is precipitated as silver chloride. This precipitate is dissolved in an ammoniacal solution

of potassium tetracyanonickelate. By dissolution, two atoms of silver (or chlorine) displace one of nickel. The freed nickel is titrated with EDTA and potassium is thus determined indirectly. The method is much more rapid than the classical gravimetric procedure, and the results are satisfactory.

Zusammenfassung

Eine Mikromethode zur Bestimmung von Kalium mit ÄDTA wird beschrieben. Der Perchloratniederschlag wird durch Erhitzen mit Ammoniumchlorid reduziert und das Chlorid mit Silber gefällt. Dieser Niederschlag wird in einer ammoniakalischen Lösung von Kaliumtetracyanonickelat aufgelöst, wobei zwei Atome Silber ein Atom Nickel verdrängen. Das freigesetzte Nickel wird mit ÄDTA titriert und so das Kalium indirekt bestimmt. Das Verfahren ist rascher als die klassische gravimetrische Methode. Seine Resultate sind befriedigend.

Résumé

On décrit une méthode de microdosage du potassium par l'EDTA. En chauffant le perchlorate avec du chlorure d'ammonium, on réduit le précipité de perchlorate en chlorure que l'on précipite à l'état de chlorure d'argent. On dissout ce précipité dans une solution ammoniacale de nickel-II tétracyanure de potassium. La mise en solution s'accompagne du déplacement d'un atome de nickel par deux atomes d'argent. On titre le nickel libéré par l'EDTA et l'on dose ainsi le potassium indirectement. La méthode est beaucoup plus rapide que le procédé gravimétrique habituel et les résultats sont satisfaisants.

References

[1] *G. F. Smith* and *J. F. Ross*, J. Amer. Chem. Soc. **47**, 744, 1020 (1923).
[2] *A. de Sousa*, Analyt. Chim. Acta **22**, 522 (1960).
[3] *W. Wense*, Z. angew. Chem. **1891**, 691, and **1892**, 233; *W. A. Caspari*, Z. angew. Chem. **1893**, 68.
[4] *H. Flaschka*, Mikrochim. Acta [Wien] **40**, 21 (1952); *H. Flaschka* and *F. Huditz*, Z. analyt. Chem. **137**, 104 (1952).
[5] *G. Schwarzenbach*, Die komplexometrische Titration. Stuttgart: F. Enke. 1956. p. 93.

Aus dem Laboratorium für analytische Chemie der Universität „C. I. Parhon", Bukarest (Rumänien)

Eine mikrogravimetrische Bestimmungsmethode für Kobalt in Gegenwart anderer Elemente

Von

Th. I. Pirtea und **M. Dumitru**

(Eingegangen am 4. April 1961)

Die zur Zeit angewandten mikrogravimetrischen Bestimmungsmethoden des Kobalts beruhen auf den entsprechenden Makromethoden. Von diesen erwähnen wir die Bestimmung als Kobaltpyrophosphat $Co_2P_2O_7$[1,2], Kobaltanthranilat $Co(C_7H_6O_2N)_2$[3], Kobalt-α-nitroso-β-naphtholat $Co(C_{10}H_6ONO)_3 \cdot 2\,H_2O$[4], wie auch als $[Co(NH_3)_6]\,[Co(NO_2)_6]$[5] und $[Co\,en_3]\,[Co(NO_2)\text{-}]$*[6].

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Verfahren zur Bestimmung von Kobalt in Form der komplexen Verbindung $[Co(C_{12}H_8N_2)_2]\,(SCN)_2$ beschrieben. Als Fällungsreagens wird eine o-Phenanthrolinhydrochloridlösung in Gegenwart von Ammoniumrhodanid benützt. Der entstandene Niederschlag ist rosa gefärbt und sehr schwer löslich. In schwach saurer Lösung können damit bis zu 0,5 μg Co/ml erfaßt werden. Die Grenzkonzentration beträgt 1 : 2000000.

Arbeitsweise: In einen Filterbecher nach *Emich* werden mittels einer Mikrobürette 0,5 bis 4 ml der schwach sauren (p_H etwa 3 bis 6) Kobaltlösung gebracht. Diese wird auf dem Wasserbad bis fast zum Sieden erhitzt, dann mit 0,05 bis 0,1 g festem NH_4SCN und 0,5 bis 2 ml einer 2%igen o-Phenanthrolinhydrochloridlösung behandelt. Man läßt den Niederschlag 5 Minuten absetzen und filtriert. Der Niederschlag wird einigemal mit einer warmen (60 bis 70° C) Lösung gewaschen, die in 100 ml dest. Wasser 0,3 g NH_4SCN und 1 ml einer 2%igen o-Phenanthrolinhydrochloridlösung enthält. Nachher wird der Niederschlag drei- bis viermal mit je 0,5 ml dest. Wasser, dann dreimal mit je 0,5 ml einer Mischung aus 1 Teil Alkohol und 3 Teilen absolutem Äther und schließlich

* en = Äthylendiamin.

dreimal mit je 0,5 ml absolutem Äther gewaschen. Nach 5 bis 10 Minuten Trocknen im Vakuumexsiccator wird gewogen. Der auf diese Weise getrockneten Verbindung entspricht die Formel $[Co(C_{12}H_8N_2)_2](SCN)_2$. Dieser entspricht der Umrechnungsfaktor 0,1101.

In Tabelle 1 sind die erzielten Ergebnisse zusammengefaßt. Die verwendete $CoCl_2$-Lösung enthält 0,000762 g Co/ml.

Tabelle 1

Nr.	ml $CoCl_2$-Lösung	mg $[Co(C_{12}H_8N_2)_2](SCN)_2$ gewogen	mg Co		Differenz mg
			gegeben	gefunden	
1	0,5	3,460	0,381	0,381	—
2	0,5	3,455	—	0,380	— 0,001
3	1,0	6,910	0,762	0,761	— 0,001
4	1,0	6,920	—	0,762	—
5	1,0	6,890	—	0,759	— 0,003
6	1,5	10,435	1,143	1,149	+ 0,006
7	2,0	13,828	1,524	1,522	— 0,002
8	2,0	13,785	—	1,518	— 0,006
9	2,0	13,830	—	1,523	— 0,001

Nach diesem Verfahren kann Kobalt auch in Gegenwart von Na, K, Ca, Sr, Ba, Mg, Be, Sc, Al, Cr und NH_4^+ bestimmt werden. Für diesen Fall muß die zu analysierende Lösung zuerst auf ein p_H von 3 bis 4 gebracht werden (Universalindikator); das Auswaschen des Niederschlages muß vorsichtig und wiederholt vorgenommen werden, damit der Niederschlag nicht mit dem Reagens NH_4SCN oder mit Salzen anderer Metalle verunreinigt bleibt. Die Tabelle 2 enthält die entsprechenden Ergebnisse. Die verwendete $CoCl_2$-Lösung enthielt 0,000295 g Co/ml.

Tabelle 2

Nr.	ml $CoCl_2$-Lösung	Anwesende Fremdionen	mg $[Co(C_{12}H_8N_2)_2](SCN)_2$ gewogen	mg Co		Differenz mg
				gegeben	gefunden	
1	0,5		1,335	0,148	0,147	— 0,001
2	1,0	Na^+, K^+, NH_4^+	2,674	0,295	0,294	— 0,001
3	1,0	Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}	2,672	—	0,294	— 0,001
4	2,0	Mg^{2+}, Be^{2+}, Sc^{3+}	5,432	0,590	0,598	+ 0,008
5	4	Al^{3+}, Cr^{3+}	10,682	1,180	1,176	— 0,004
6	4		10,743	—	1,183	+ 0,003

Zusammenfassung

Es wird eine neue mikrogravimetrische Bestimmungsmethode für Kobalt als $[Co(C_{12}H_8N_2)_2](SCN)_2$ beschrieben. Als Fällungsreagens wird eine wäßrige o-Phenanthrolinhydrochloridlösung in Gegenwart von

Ammoniumthiocyanat benützt. Das Verfahren ermöglicht die Bestimmung von Kobalt auch in Gegenwart von Na, K, Ca, Sr, Ba, Mg, Be, Sc, Al, Cr und NH_4^+ ohne vorhergehende Maskierung.

Summary

A new microgravimetric method for determining cobalt as $[Co(C_{12}H_8N_2)_2] \cdot (SCN)_2$ is described. The precipitant is an aqueous solution of *o*-phenanthroline hydrochloride in the presence of ammonium thiocyanate. The procedure permits the determination of cobalt even in the presence of Na, K, Ca, Sr, Ba, Be, Sc, Al, Cr, and NH_4^+ without previous masking.

Résumé

On décrit une nouvelle méthode de dosage microgravimétrique du cobalt à l'état de $[Co(C_{12}H_8N_2)_2] (SCN)_2$. On a utilisé comme réactif précipitant une solution aqueuse de chlorhydrate d'*o*-phénanthroline en présence de thiocyanate d'ammonium. Le procédé permet le dosage du cobalt sans masquage préalable, même en présence de Na, K, Co, Sr, Ba, Mg, Be, Sc, Al, Cr et NH_4^+.

Literatur

[1] *R. Strebinger* und *J. Pollak*, Mikrochem. **4**, 17 (1926).

[2] *J. Pollak*, Mikrochem. **2**, 190 (1924).

[3] *P. Wenger*, *Ch. Cimerman* und *A. Corbaz*, Mikrochim. Acta [Wien] **2**, 314 (1937); Mikrochem. **27**, 85 (1939).

[4] *F. Hecht* und *F. Korkisch*, Mikrochim. Acta [Wien] **3**, 313 (1938).

[5] *Th. I. Pirtea* und *Polly Bucsan*, Analele Univ. „C. I. Parhon" (Bukarest), Seria St. Naturii **16**, 71 (1957).

[6] *Th. I. Pirtea* und *M. Dumitru*, Revista de Chimie **10**, 640 (1959).

Chemical Laboratories, Banaras Hindu University, Varanasi-5, India

A New Sensitive and Specific Test for Cobalt

By

V. D. Anand*

(Received, December 1, 1960)

The *p*-nitrophenylhydrazone of diacetylmonoxime[1] and the 2,4-dinitrophenylhydrazone of diacetylmonoxime[2] have been described as specific reagents for cobalt. In a spectrophotometric study of the use of the former as a reagent for cobalt, it was found, however, that its cobalt complex is rather unstable[3]. To ascertain whether the compound could be modified to give better stability of the cobalt complex without impairing sensitivity or selectivity, the *p*-nitrophenylhydrazone of 3-isonitrosopentane-2-one was prepared. The following report deals with the study of this compound.

Preparation of 3-Isonitrosopentane-2-one

Mix 100 g methyl-*n*-propylketone with 3 ml concentrated hydrochloric acid in a three-necked Pyrex flask. In the course of two hours, add 100 ml amylnitrite with stirring and cooling so that the temperature never rises above 50° C. Then add 80 g ice and 80 g of 33% sodium hydroxide and extract the released amyl alcohol with a large volume of ether. Acidify the alkaline aqueous phase with dilute sulfuric acid so that the temperature remains below 10° C at all times. Collect the brownish oil which rises to the top of the mixture and purify it by repeated vacuum distillation. Thus, the 3-isonitrosopentane-2-one is obtained as a white crystalline mass with melting point 54 to 55° C in the capillary and boiling point 94 to 95° C at 15 mm Hg.

Preparation of p-Nitrophenylhydrazone of 3-Isonitrosopentane-2-one

Prepare a solution of 1.5 g *p*-nitrophenylhydrazine in 100 ml hot water. Acidify it with a few drops of acetic acid and add it to a solution of 1.2 g

* Present Address: Indian Institute of Technology, Kanpur, India.

3-isonitrosopentane-2-one in 100 ml hot water. Keep the mixture on the steam bath for about 30 minutes. Collect the separating fluffy orange mass on a filter and purify it be recrystallization from hot ethanol. A deep yellow powder is obtained which has a melting point of 235 to 236° C in the capillary. The yield should be about 50% of the theoretical. Analysis by Drs. *Wielar* and *Straus** gave 53.06% carbon and 5.15% hydrogen whereas the formula $C_{11}H_{14}N_4O_3$ requires 52.8% and 5.6%.

Test for Cobalt

One drop of cobalt test solution is placed into a micro test tube and treated with two drops of concentrated ammonia and two drops of a 0.1% solution of *p*-nitrophenylhydrazone of 3-isonitrosopentane-2-one in ethanol. A pink or red coloration indicates cobalt. If the solution remains orange add 0.5 ml of ether and agitate. The aqueous layer turns pink if small amounts of cobalt are present.

Determined were a limiting dilution of the cobalt test solution of 1 : 2 million and a limit of identification of 0.05 μg Co.

Once formed, the red cobalt compound proved remarkably stable. No visible change in the intensity of the coloration was observed when the test was kept for two hours. The coloration remained unchanged also upon the addition of cyanide, phosphate, sulfosalicylate, complexon III, or ammonium salts to the red solution. No coloration appeared, however, if the reagent was added to cobalt solutions containing either cyanide or an excess of ammonium salts.

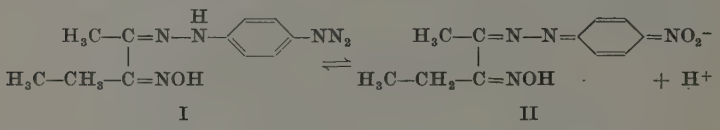
Soluble ammine forming metals other than cobalt do not give colorations with the reagent under the conditions of the test. The following cations and anions permit performance of the test for cobalt: Li, Na, K, Mg, Ca, Sr, Ba, Ti(4), Zr, Th, V(5), Cr(3), Mo(6), W(6), UO_2^{2+}, Mn(2), Fe(2 and 3), Ni, Pd, Cu, Ag, Au(1), Zn, Cd, Hg(1 and 2), Al, Tl(1), Sn(4), Pb(2), As(3), Sb, Bi, Se(4), and Te(4). If, however, considerable amounts of metal hydroxide precipitate, filtration is necessary.

The use of ammonia in the test is not obligatory since the coloration is also obtained, though to a lesser extent, when triethanolamine, ethylene, diamine, magnesium oxide or calcium oxide is added in the place of ammonia. Pyridine cannot take the place of ammonia, but does not interfere with the test. Attempts to extract the red cobalt complex with common organic solvents were without success.

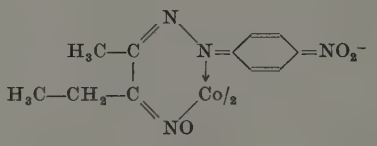
The equilibrium between forms I and II of the reagent is determined by the hydrogen ion concentration. Alkali hydroxide gives a red solution, the color being almost identical with that of the cobalt complex, which

* 164 Banbury Road, Oxford, U. K.

obviously contains form II of the reagent. In ammoniacal solution, conversion to form II will take place only sparingly because of the low hydroxyl ion concentration; the solution has an orange color, and compound I may be extracted with ether after diluting with water. The cobalt complex probably has structure III.



I II



III

Acknowledgements

Grateful thanks of the author are due to Professor *S. S. Joshi* and Dr. *G. S. Deshmukh* for their keen interest. He is also grateful to the Ministry of Scientific Research and Cultural Affairs for the award of a Senior Scholarship during the course of the present study.

Summary

The *p*-nitrophenylhydrazone of 3-isonitrosopentane-2-one gives in ammoniacal solution a red coloration with cobalt, which provides a sensitive and specific test. Cyanide as well as a high concentration of ammonium salts prevent the test. Palladium, silver, nickel, copper and most common cations and anions do not interfere.

Zusammenfassung

Das p-Nitrophenylhydrazon von 3-Isonitrosopentan-2-on gibt in ammoniakalischer Lösung mit Kobalt eine Rotfärbung, die dessen empfindlichen und spezifischen Nachweis ermöglicht. Cyanid sowohl wie eine hohe Ammoniumsalzkonzentration verhindern die Probe. Palladium, Silber, Nickel, Kupfer und die meisten der gewöhnlichen Kationen und Anionen verursachen keine Störung.

Résumé

La *p*-nitrophénylhydrazone de l'isonitroso-3 pentanone-2 donne en solution ammoniacale une coloration rouge avec le cobalt que l'on utilise

comme essai sensible et spécifique. Les cyanures, ainsi que de fortes concentrations en sels de l'ammonium, gênent l'essai. Le palladium, l'argent, le nickel, le cuivre et les cations et anions les plus fréquents n'interfèrent pas.

Literature

[1] *F. Feigl* and *D. Goldstein*, Analyst **81**, 709 (1956).
[2] *V. D. Anand* and *G. S. Deshmukh*, Naturwiss. **23**, 648 (1956).
[3] *G. S. Deshmukh*, *V. D. Anand*, and *C. M. Pandey*, Ph. D. Thesis of *V. D. Anand*, Banaras Hindu University, 1960.

From the Department of Chemical Technology, University of Bombay, Matunga, Bombay-19

The Microdetermination of C-Methyl Groups in Organic Compounds

By

T. S. Gore and **S. S. Gupte**

(Received February 6, 1961)

The microdetermination of carbon-linked methyl groups in organic compounds has attracted little attention since the method was first described by *Kuhn* and *Roth*[1] in 1933. This may partly be attributed to the fact that except for certain types of compounds, good values for this functional group are seldom obtained, and the results must be interpreted in comparison with the values obtained for a set of reference compounds. A closer examination of the existing microprocedures was therefore thought worth while, and a large number of compounds have been analysed employing the existing and modified procedures. The results are presented and discussed.

The success of the C-methyl determination depends on the fulfilment of two conditions; 1) that under the conditions employed in the experimental procedure, all the $CH_3-C\diagup\diagdown$ groups are quantitatively oxidised to acetic acid, and 2) that the acetic acid so formed is not further oxidised to carbon dioxide and water. In the Kuhn-Roth procedure[2] the sample is boiled for 90 minutes with 5 ml of the oxidising mixture; the excess of chromic acid is reduced, and after acidifying the reaction mixture with phosphoric acid, the acetic acid is distilled off and titrated. In the procedure modified by *Ginger*[3], the quantity of sulphuric acid in the oxidising reagent was doubled but the distillation was carried out as in the Kuhn-Roth method, except that the distillate was collected in 15 successive 5-ml portions and titrated. This was a very tedious operation, and also increased the cumulative blank error. The Kuhn-Roth procedure employed in this study is essentially identical with the standard

procedure[2] except that the digestion was carried out in a phosphoric acid bath (bath temperature 125–130° C) and that the acetic acid was distilled off directly from the reaction mixture. It was observed that by adjusting the bath temperature to 150–160° C and adding three or four platinum tetrahedra to the reaction mixture, the distillation could be carried out smoothly and without any carry-over of sulphuric acid spray in the distillate. Liquids and low-melting solids, however, could not be properly oxidised in the Kuhn-Roth assembly, because during the digestion the sample was volatilised, and collected in the neck of the flask, and was thus partially removed from the digestion mixture. Such substances were therefore digested in sealed pressure tubes at 130° C in an electric furnace and the distillations were carried out in the Kuhn-Roth assembly. The performance and the accuracy of the determination were improved when samples, irrespective of their nature, were digested in sealed pressure tubes[4,5], and the distillations were carried out in the Kuhn-Roth apparatus. In addition, the overall time of the experiment was considerably shortened, since the two operations could be carried out separately.

The Kuhn-Roth apparatus and the procedure for the microdetermination of the C-methyl groups were substantially modified by *Wiesenberger*[6,7]. In Wiesenberger's procedure[8], the sample is oxidised by using 2 ml of the oxidising mixture for 1.5 hours at 165–170° C (bath temperature), and the acetic acid so formed is directly distilled off. About 31 ml of the distillate is collected and titrated with centinormal alkali. Following the detailed instructions, we observed that the rate of distillation was slower than claimed. Further, at every addition of water from the reservoir to the digestion flask to replace the distillate, the heating bath had to be lowered, and this operation had to be repeated 15–20 times before the required quantity of distillate was collected. It was further observed that a second distillate of 30 ml consumed 0.7 to 1.0 ml of the alkali and so the distillation had to be continued in a similar manner for a second collection of the distillate; one complete determination thus required about 4.5 hours. In addition, the C-methyl values obtained by following this procedure (see Table I), were invariably lower than the values obtained by the other methods. The performance of Wiesenberger's method was therefore not regarded as satisfactory.

Stronger solutions and higher temperatures of digestion have been avoided since they not only increase the rate of oxidation, but also the rate of decomposition of the acetic acid. *Tashinian, Baker* and *Koch*[4] have critically examined the stability of acetic acid in the presence of sulphuric acid, alone and in the presence of dichromate solution, at different temperatures and concentrations. The results presented by them are, however, insufficient, and a fresh study of the stability of

acetic acid at temperatures varying between 100–300° C, with a period of digestion varying between 15–90 minutes, in the presence of chromic-sulphuric acid mixtures of varying concentrations, as employed in this determination was, therefore, undertaken. The results (see Table II) indicate the basic limitations of this method, and rule out the possibility of employing higher temperatures and longer periods of oxidation. Using the Kuhn-Roth acid oxidation mixture, and digesting the acetic acid for 30 minutes at 175° C, more than 19% of it is destroyed. However, from the results on the stability of acetic acid, the optimum conditions of time, temperature and concentration of chromic acid in the chromic-sulphuric acid mixture, for the microdetermination, could be very usefully chosen. The study of the stability of acetic acid, when heated with still stronger solutions of the acid-mixture for longer periods but at lower temperatures, should be interesting and is being carried out.

A simple approach, to avoid the destruction of acetic acid formed as a result of the oxidation of the C-methyl groups, is to carry out the oxidation and distillation simultaneously[9,10], so that the acetic acid is distilled off as soon as it is formed, and its further oxidation is avoided. A few microdeterminations were carried out along these lines, using the Kuhn-Roth assembly, set up for distillation. The digestion of the sample, and the distillation of the acetic acid formed, were carried out simultaneously at 155–165° C (bath temperature) for 25–30 minutes, during which time the volume of the reaction mixture was kept constant by dropwise addition of distilled water from the reservoir funnel; about 40–45 ml of the distillate were collected. This was either titrated directly, or was redistilled, and the fresh distillates were titrated as in the Kuhn-Roth procedure. There are certain limitations to this procedure also; liquids and low-melting solids could not be handled satisfactorily. The modified micromethod, however, is quick, since the determination could be completed in 45 minutes, and this procedure is being standardised. Following this procedure, the effect of stronger acid mixtures on the determination is also being studied.

Experimental

The Kuhn and Roth Method

Apparatus: The Kuhn-Roth micro-assembly as supplied by Messrs. A. H. Thomas Company*, was used.

Reagents: A 5 *N* chromic acid solution, prepared according to *Pregl*[2], and analytical grade sulphuric acid, $d = 1.84$, were used.

Procedure A: About 4–7 mg of the sample were accurately weighed into the digestion flask of the apparatus; 4 ml of the cooled acid mixture,

* Catalogue No. 6441, Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, USA.

consisting of 4 ml of the 5 *N* chromic acid solution and 1 ml of the sulphuric acid, and two platinum tetrahedra* were added, and the reaction mixture was heated in a phosphoric acid bath at 125–130° C (bath temperature) for 90 minutes under reflux. A slow current of nitrogen or oxygen, at an approximate velocity of one bubble per second, was bubbled through the reaction mixture during oxidation and also later, during distillation. The reaction mixture was then cooled, and the condenser was washed down with 5–7 ml of distilled water. The condenser was then removed from the reaction flask, washed out with 100–125 ml of distilled water, and set for distillation from the flask, to which two more platinum tetrahedra were added. The reaction mixture was then directly distilled, using the phosphoric acid bath at 150–160° C, and maintaining the rate of distillation at about 1–1.5 ml per minute; the distillate was collected in four lots of 30, 20, 15 and 10 ml each. Each lot of the distillate, after having added to it a crystal of analytical grade barium chloride, was boiled for 5–6 seconds on a wire gauze, heated by means of a standard gas flame below, and was quickly titrated with 0.01 *N* sodium hydroxide solution to the first permanent pink of phenolphthalein. The last lot of the distillate usually gave a reading of 0.1 ml of the alkali, which was more or less equal to the blank titre.

Procedure B: About 4–7 mg of the sample were accurately weighed and transferred to the digestion tube (Carius type, 100–120 mm long, 8–9 mm internal diameter and 10–11.2 mm outside diameter) made out of thick-walled Pyrex tubing, 4 ml of the acid mixture, prepared as described in procedure A, were added to it carefully, rinsing down any residue of the sample adhering to the inside of the tube. The digestion tube was then cooled, sealed and heated at 130° C in a Carius furnace (gas-heated or electrically heated) for 90 minutes. The tube was then opened, and the contents were transferred quantitatively to the reaction flask of the Kuhn-Roth assembly, using 8–10 ml of distilled water. Four platinum tetrahedra were added to the reaction mixture, and after starting the oxygen flow, the distillation and the titration of the distillates were carried out exactly in the same manner as described in Procedure A.

Procedure C: About 6–8 mg of the sample were weighed into the reaction flask of the Kuhn-Roth assembly, which was then set up in the distillation position[11]. The oxidation acid mixture (4 ml) prepared as in Procedure A, was then added to it, followed by four platinum tetrahedra, and the oxygen (or nitrogen) flow was started. The reaction flask was then heated in a phosphoric acid bath. While the temperature of the bath was slowly raised to 155–160° C, the digestion and distillation

* Catalogue No. 8313, Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, USA.

were continued simultaneously for 25–30 minutes, during which time the volume of the reaction mixture was kept constant by dropwise addition of distilled water from the reservoir funnel; 40–50 ml of the distillate were collected. The reaction mixture was cooled, and the condenser was washed down with 5–8 ml of distilled water, collecting the washings in the flask containing the distillate. The distillate was titrated directly, or alternatively it was redistilled and the second distillate was collected in lots and titrated exactly as described in Procedure A.

Procedure D: Wiesenberger's method. The apparatus was constructed according to British specification[12], and the microdeterminations were carried out exactly as described by *Clark*[8].

Results and Discussion

Following procedures A, B, C and D, outlined above, a number of simple organic compounds were analysed for their C-methyl values. Several of these were analysed by all four procedures, and several others by varying the conditions of temperature, time and the concentration of chromic acid in the acid-mixture. All the results are tabulated in Table I, and the variations in the standard procedures have been mentioned in the foot-notes.

Table I

Ref. No.	Compound	% C-Methyl (calculated)	% C-Methyl (Found)			
			Procedure A	Procedure B	Procedure C	Procedure D
1	Sodium acetate	11.0	11.0, 10.9[a]	10.8[b]		10.8
2	Crotonic acid	17.4	16.5	17.1, 17.6[b]	17.1, 16.8	12.7, 11.6
3	Toluene	16.3	0.4[a], 0.7[a]	5.0[b], 4.9[b], 9.4[c], 3.7[k], 3.5[b]		
4	*p*-Xylene	28.3		7.6[b], 9.2		
5	*o*-Xylene	28.3	1.0[a]	11.0, 12.9[b], 14.0[c], 14.0[d], 15.9[k], 15.7[l]		
6	*o*-Chlorotoluene	11.9		1.5, 1.4		
7	*p*-Chlorotoluene	11.9		5.2, 5.4		
8	*o*-Toluidine	14.0		13.8		
9	*p*-Toluidine	14.0		12.3, 12.1		
10	*o*-Nitrotoluene	11.0		1.5, 1.3		
11	*p*-Nitrotoluene	11.0		2.0, 1.7		
12	2,4-Dinitrotoluene ...	8.2		1.7, 1.2		
13	2-Methoxy-4-nitro-toluene	9.0	5.7	9.0, 8.7, 8.6		
14	*o*-Cresol	13.9	13.1[a]	12.4[b]		

(Continuation of Table 1)

Ref. No.	Compound	% C-Methyl (calculated)	% C-Methyl (Found)			
			Procedure A	Procedure B	Procedure C	Procedure D
15	*m*-Cresol	13.9	11.3, 14.0[a]	12.3, 13.7[b], 13.7[b], 11.7[c]		9.0, 8.3
16	*p*-Cresol	13.9	10.3[a]	9.8[b]		
17	Resorcinol	nil	nil	nil		
18	*n*-Hexylresorcinol	7.7	7.5[a]			
19	2-Acetoresorcinol	9.9	9.3, 7.6[a], 7.2[a]	10.2, 10.3, 10.4	10.1, 10.3	7.5
20	4-Acetoresorcinol	9.9	9.9, 9.0[a], 8.7[a]	10.3, 10.1, 9.1[b]	9.9	7.6
21	2,4-Diacetoresorcinol	15.5	15.4, 15.0, 15.0[a], 14.9[a]	15.5, 15.6, 14.7[b]	15.9, 14.8	12.0, 10.2, 10.0
22	4,6-Diacetoresorcinol	15.5	15.5, 14.8[a]	15.0, 15.0	16.0	13.7
23	Methyl-2,6-dihydroxy-3-methylbenzoate	8.2	7.8, 6.8[a]	7.9, 8.5	7.5	
24	2,6-Dihydroxy-4-methyl-benzoic acid	8.9	6.3[a]			
25	2,6-Dihydroxy-3,5-dimethyl-benzoic acid	16.5	13.7[a]			
26	2-Ethylresorcinol	10.9	11.2	10.9, 10.8, 11.1	11.2, 11.3	10.2
27	4-Ethyl-5-methyl-resorcinol	19.7	16.1	15.4	14.9	
28	Orcinol	12.1		10.2, 10.2	7.7	
29	1-Methyl-β-naphthol-6-ethyl-*n*-propionate	11.6	7.7, 9.8[a]			
30	2-Hydroxy-1-methyl-6-*n*-propyl-naphthionate	12.3	6.6, 7.7[a]	7.7, 7.2		
31	2-Hydroxy-1-methyl-6-isopropyl-naphthionate	18.4	0.8, 0.4			
32	2-Hydroxy-1-methyl-6-isobutyryl-naphthionate	17.4	4.6, 4.3	7.7, 7.6		
33	1-Methyl-6-*n*-propyl-β-naphthol	15.0	7.7, 6.8			
34	6-*n*-Butyl-1-methyl-β-naphthol	14.0	8.5, 5.5	9.6		
35	3-Bromo-2-hydroxy-1-methyl-6-naphthoic acid	5.3	0.6			
36	1-Methyl-naphthalene	10.6		6.0, 5.6		
37	1-Ethyl-6-propionyl-β-naphthol	13.2	11.8, 11.6	13.2, 13.2, 12.0[b], 10.0[j]		

(Continuation of Table I)

Ref. No.	Compound	% C-Methyl (calculated)	% C-Methyl (Found)			
			Procedure A	Procedure B	Procedure C	Procedure D
38	1-Ethyl-2-methoxy-6-aceto-naphthalene	13.2	6.3, 6.2			
39	1-Ethyl-2-methoxy-6-propionyl-naphthalene	12.4	12.3, 12.1[a]			
40	1-Ethyl-2-methoxy-naphthalene	8.1		7.9, 8.0[g]		
41	1-Ethyl-2-ethoxy-naphthalene	15.0	8.9	13.9, 13.8, 14.0[f], 13.4[h], 10.4[j]	11.2	
42	2-Aceto-1-methoxy-naphthalene	7.5		7.2		
43	2-Methyl-anthracene	7.8	0.6, 2.4[m]	0.5, 0.6	0.6	
44	2-Ethyl-anthra-quinone	6.4	0.2[a]	0.6[b]		
45	1-Hydroxy-2-methyl-anthraquinone	6.3	6.1[a]			
46	1-Hydroxy-3-methyl-anthraquinone	6.3	6.0[a], 5.8[a]			
47	3-Methylalizarin	5.9	6.1[a]			
48	Erythrolaccin	5.2	5.0[a]			
49	Chrysophanic acid	5.9	5.1[a], 4.9[a]			
50	1,4-Dimethoxy-2-ethylanthraquinone	5.1	5.0[a]			
51	Citrinin[13]	18.0		17.6, 17.6	18.1, 17.5	
52	Thymol	30.0 (20.0)		18.0, 18.6		

[a] Temp. was maintained at 160–165° C for 90 minutes. [b] Temp. was maintained at 150–155° C for 90 minutes. [c] 6.0 *N* chromic acid was used. [d] 7.0 *N* chromic acid was used. [e] Temp. was maintained at 125–130° C for 15 minutes. [f] Temp. was maintained at 125–130° C for 3 hours. [g] Temp. was maintained at 125–130° C for 4 hours. [h] Temp. was maintained at 160° C for 1 hour. [i] Temp. was maintained at 130° C for first 1.5 hours and at 150° C for second 1.5 hours, total oxidation time was three hours. [j] Temp. was maintained at 150° C for 3 hours. [k] 7.0 *N* chromic acid was used and the temp. was maintained at 130° C for first 1.5 hours and 150° C for further 1.5 hours. [l] 7.0 *N* chromic acid was used and the temp. was maintained at 150° C for three hours. [m] 7.0 *N* chromic acid was used and the temp. was maintained at 160–165° C for 90 minutes.

Stability of Acetic Acid: Following Procedure B, the stability of acetic acid to oxidation, by chromic-sulphuric acid mixtures of varying concentrations, at temperatures varying between 130–300° C, and with a digestion period varying between 15–90 minutes, was examined.

About 6–8 mg of acetic acid (Analytical Reagent Grade) were very accurately weighed in a glass capillary, which was then put into the Carius tube. The capillary was then crushed in the tube by means of a glass rod, and 2 ml of the oxidising acid-mixture were added, and the glass-rod was washed down thoroughly and carefully. The Carius tube was then sealed, the contents were digested, and the acetic acid was distilled and titrated as described in Procedure B. Several microdeterminations were carried out and the values (which are the mean values of duplicates, agreeing within $\pm$ 0.4) of the percent acetic acid recovered are recorded in Table II. The stability of benzoic acid was also determined in the same manner and the results are recorded in Table III.

Table II. Stability of Acetic Acid
(Percent acetic acid recovered)

Concentration*	Temperature °C ± 3	Percent acetic acid recovered			
		Time of oxidation in minutes			
		15	30	60	90
5.0 *N*	150	99.7	98.5	101.5	100
7.0 *N*	150	100.5	96.8	93.0	90.5
10.0 *N*	150	97.6	95.9	91.5	84.8
5.0 *N*	175	95.0	80.9	67.7	45.3
5.0 *N*	200	45.4	23.4	12.4	11.8
7.0 *N*	200	47.2	19.6	5.9	2.2
10.0 *N*	200	22.7	8.6	3.0	3.2
5.0 *N*	250	18.5	4.4	0.9	1.4
7.0 *N*	250	11.8	3.2	0.6	2.8
10.0 *N*	250	7.3	5.5	3.6	2.7
5.0 *N*	300	11.1	2.8	4.0	1.1
7.0 *N*	300	6.8	3.3	3.2	0.7
10.0 *N*	300	1.0	2.0	1.6	1.0

* The concentration is with respect to chromic acid i. e. 4 parts of 5.0 *N* chromic acid are mixed with 1 part of conc. sulphuric acid, sp. gr. 1.86, by volume, etc.

From the results recorded in Tables I, II and III, the following observations can be made.

1. Among the four procedures outlined for the microdetermination of C-methyl groups in organic compounds, Procedure B, in which the sample is digested in a sealed tube and the contents are distilled in the Kuhn-Roth assembly, was easy in operation and quicker, and it gave good results. Wiesenberger's procedure, employing his apparatus (Procedure D), is lengthy and rather tedious in operation, and it gave lower values. Procedure C, which is a modification of the simultaneous

digestion and distillation method of *Kuhn* and *L'Orsa*[9] and its adaptation to a micromethod, was the quickest (the estimation could be completed in 45 minutes) and also gave good values.

Table III. Stability of Benzoic Acid
(Percent benzoic acid recovered)

Concentration*	Temperature °C ± 3	Percent Benzoic acid recovered			
		Time of oxidation in minutes			
		15	30	60	90
5.0 *N*	130	81.6	57.5	44.0	25.5
7.0 *N*	130	78.3	43.1	25.7	15.0
5.0 *N*	150	33.1	12.9	7.3	4.1
7.0 *N*	150	27.7	9.9	6.3	4.9
5.0 *N*	175	8.1	6.3	4.7	5.9
7.0 *N*	175	6.4	3.4	3.0	3.1

* The concentration is with respect to chromic acid i. e. 4 parts of 5.0 *N* chromic acid are mixed with 1 part of conc. sulphuric acid, sp. gr. 1.86, by volume, etc.

2. The results of the C-methyl determination on a series of compounds support the general observation that the Kuhn-Roth method has its limitations, and cannot be used for determining precisely the number of C-methyl groups present in an organic compound. Aromatic hydrocarbons containing C-methyl groups failed to give correct values, but hydroxy (mono- and di-)- and amino-substituted compounds gave good results. Nitrotoluenes, however, gave very low values, as expected. Oxidation with chromic-sulphuric acid mixture of compounds 3 to 7 (Table I) also results in the formation of aromatic carboxylic acids, and the interpretation of the results becomes difficult. In the naphthalene series the results follow the same pattern. Methylanthracene and ethylanthraquinone gave very poor values, but their hydroxy-substituted derivatives gave very good results.

3. The results on the stability of acetic acid to oxidation, when heated with chromic-sulphuric acid mixture of different strengths at different temperatures and for varying periods of time, clearly indicate the limitations under which this determination can be carried out. The results on the stability of benzoic acid clearly show that benzoic acid is almost completely destroyed when heated at 150° C with 5 *N* chromic acid mixture for 90 minutes.

Acknowledgement

The authors wish to thank Mr. *S. Y. Pandit* of this Department for giving them the compounds numbers 29–42 (Table I).

Summary

Existing standard procedures for the microdetermination of C-methyl groups in organic compounds have been discussed, and a modified micromethod, in which the oxidation of the sample and the distillation of the resulting acetic acid are carried out simultaneously, has been presented. New and useful information on the stability of acetic acid, when heated in presence of chromic-sulphuric acid mixture of varying strengths, for periods ranging between 15–90 minutes, and at temperatures varying between 130–300° C, has been given. A number of simple organic substances have been analysed for their C-methyl values by the different procedures, and the results have been recorded and discussed.

Zusammenfassung

Bekannte Verfahren für die Mikrobestimmung von C-Methylgruppen in organischen Verbindungen wurden diskutiert und eine modifizierte Mikromethode vorgeschlagen, bei der die Oxydation der Substanz und die Destillation der dabei entstehenden Essigsäure gleichzeitig durchgeführt werden. Neue und wertvolle Angaben über die Beständigkeit der Essigsäure gegenüber heißer Chromsäure-Schwefelsäure verschiedener Konzentration bei Einwirkungszeiten von 15 bis 90 Minuten und Temperaturen zwischen 130 und 300° werden gemacht. Eine Reihe einfacher organischer Substanzen wurden nach verschiedenen Verfahren auf ihren C-Methylgehalt untersucht; die Ergebnisse werden angeführt und diskutiert.

Résumé

On a discuté les procédés «standards» existant pour doser les groupes C-méthylés dans les composés organiques et l'on a présenté une microméthode modifiée dans laquelle l'on effectue simultanément l'oxydation de l'échantillon et la distillation de l'acide acétique résultant. On a donné une indication nouvelle et utile sur la stabilité de l'acide acétique chauffé en présence du mélange sulfochromique de forces différentes, pendant des durées allant de 15 à 90 minutes et à des températures comprises entre 130 et 300° C. On a analysé un certain nombre de substances organiques du point de vue de leurs teneurs en C-méthylés au moyen de différents procédés et l'on a rassemblé et discuté les résultats.

References

[1] *R. Kuhn* and *H. Roth*, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 1274 (1933).

[2] *F. Pregl*, Quantitative Organic Microanalysis, 5th ed. London: J. and A. Churchill Ltd. 1951. p. 206.

[3] *L. G. Ginger*, J. Biol. Chem. **156**, 453 (1944).

[4] *V. H. Tashinian, M. J. Baker*, and *C. W. Koch*, Analyt. Chemistry **28**, 1305 (1956).

[5] *W. Kirsten* and *E. Stenhagen*, Acta Chem. Scand. **6**, 682 (1952).
[6] *E. Wiesenberger*, Mikrochem. **33**, 51 (1948).
[7] *E. Wiesenberger*, Mikrochem. **42**, 127 (1954).
[8] *S. J. Clark*, Quantitative Methods of Organic Microanalysis, 1st ed. London: Butterworths Scientific Publications. 1956. p. 171.
[9] *R. Kuhn* and *F. L'Orsa*, Z. angew. Chem. **44**, 847 (1931).
[10] *R. U. Lemieux* and *C. B. Purves*, Canad. J. Res., Sect. B **25**, 485 (1947).
[11] l. c. [2], p. 201.
[12] British Standard 1428: Part c-2: 1954.
[13] *T. S. Gore*, *T. B. Panse*, and *K. Venkataraman*, Proc. Ind. Academy Sci., Sect. A, **29**, No. 5, 289 (1949).

Environmental Assessment Unit, Occupational Health Division, Department of National Health and Welfare, Ottawa, Canada

Microslide Ring Dishes

(Short communication)

By

J. L. Monkman

With 1 Figure

(Received July 15, 1960)

There is a need in chemical microscopy for a crystallizing dish which can be used under low power magnification with transmitted ordinary and polarized light. Obviously, crystallization on an optically flat surface will be best for microscopic observation. When a large number of similar samples have to be processed, the dish should be available in quantity.

Flaschenträger[1] has described a micro evaporating dish of glass having an optically flat bottom. This dish is expensive, however, and its use in chemical microscopy is limited because of its rather large size. *Emich*[2] has described the use of dishes consisting of a cylindrical glass ring placed on a microscope slide. It has been found easy to prepare these in quantity with the glass ring permanently cemented to the slide.

Glass rings are commercially available from scientific supply houses at reasonable cost. They can also be obtained with a glass cutting saw. Since, in our work, we wished to use a maximum magnification of 100 with a polarizing microscope, the overall height of the dishes was dictated by the working distance of this optical system. This, in our case, permitted dishes with a maximum depth of about 5 mm. The inside diameter of our dishes varies between 15 and 25 mm. Deeper dishes with larger capacities may be used with larger working distances.

The dish is constructed on a microslide. The two common sizes, 25 mm × 75 mm and 25 mm × 38 mm, will serve. This, of course, limits the outer diameter of the ring to about 28 mm. The smaller slide is perhaps more versatile since it is the standard size used on the Kofler hot stage. This so-called half-slide can also be used with any standard mechanical stage.

Slides are selected for thickness and color, and the rings are inspected for cutting cracks and smooth edges. Rings are then cemented centrally to the slides, Fig. 1. Selected slides and rings are placed on the cast aluminum top of an electric hot plate set to operate at 180° to 200° C. When the glass pieces have attained the temperature of the hot plate, a ring is picked up with forceps and placed upon a flat block of Araldite AN 120 (CIBA), until a continuous molten layer is formed on the lower surface. The glass ring is then quickly transferred to one of the slides on the hot plate. Pressure is cautiously applied to get a uniform and continuous seal. By elevating the microslide above eye level it is easily seen whether or not the seal is continuous. The completed assembly is allowed to remain on the hot plate for at least an hour to cure.

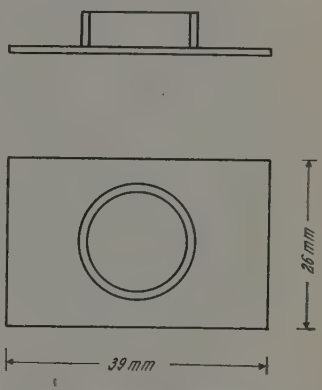


Fig. 1. Ring Dish, nat. size

Some experience is necessary to produce neat joints by hand because of the tendency for horizontal slipping. Pressure may also be applied by an arbor press if available. After some practice, however, it will be found that only a few rejects result. These rejects, having too much cement or an incomplete seal, may be salvaged by placing the uncured assembly in warm concentrated nitric acid. The rings and slides separate and may be washed, dried, and used again.

A smooth Araldite surface may be prepared by placing three or four six-inch sticks of Araldite together on an aluminum block which is heated until the Araldite just fuses to a smooth continuous surface. The block is warmed to 50° C before use. Alternatively, Araldite AN 120 may be powdered in a mortar and dusted evenly on a flat surface so that the hot ring may be applied to the powder. The cured dishes may be treated with acetone in a beaker, dried, immersed in warm chromic-acid cleaning solution, washed, and dried.

These dishes have been used for five years in this laboratory. The crystallization for photomicrography of calcium sulfate found in air samples was carried out in such dishes[3]. They are useful for fractional

crystallization of large numbers of small samples. The mother liquor from a crystallization may be easily removed with a capillary pipet and transferred to another dish where crystallization may be repeated. Many successive crystallizations and transfers may thus be carried out.

Solubility characteristics can be investigated by application of selected solvents in the confines of the ring with the method of *Jaecker* and *Schneider*[4]. The dishes may be used directly for the determination of melting points on the Kofler hot stage. By placing a cover slip or half-slide upon the rim of the ring, separations and purifications can be made by sublimation. Extracts of trace amounts of crystalline material as found in air pollution samples may be conveniently evaporated to dryness in such dishes. By taring the dishes beforehand on a microbalance, it is possible to weigh the crystalline residues.

Since the dishes are inexpensive and easily prepared, a large stock of clean dishes can be kept on hand, and it is probable that additional uses will be found.

Literature

[1] *B. Flaschenträger* and *Mohamed Soliman Zein*, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 1957.

[2] *F. Emich* and *F. Schneider*, Microchemical Laboratory Manual. New York: Wiley. 1932. p. 24.

[3] *L. Sumi, A. Corkery*, and *J. L. Monkman*, Calcium Sulfate Content of Urban Air. Geophysical Monograph No. 3, American Geophysical Union Publication 652, 1959; p. 69.

[4] *J. A. Jaecker* and *F. Schneider*, Mikrochim. Acta [Wien] **1959**, 801.

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften

Österreichische Gesellschaft für Mikrochemie

Die Österreichische Gesellschaft für Mikrochemie im Verein Österreichischer Chemiker hielt am 20. Januar 1961 in Graz ihre XIV. ordentliche Jahreshauptversammlung mit anschließender wissenschaftlicher Sitzung ab.

Der Präsident Prof. Dr. *H. Lieb* gedachte der Verdienste des am 9. August 1960 im Alter von 83 Jahren in Graz verstorbenen Ehrenmitgliedes der Gesellschaft, Prof. Dr. *Julius Donau*, des engsten Mitarbeiters von *F. Emich*.

Anschließend berichtete der Präsident über die Tätigkeit der Gesellschaft im abgelaufenen Jahr. Am 27. Januar 1960 sprach Dr. *W. Schöniger*, Sandoz A. G. Basel, in Graz über die Weiterentwicklung der Kolbenmethode in der quantitativen organischen Mikroanalyse und am 1. Juni 1960 hielt Prof. Dr. *H. Weisz*, Institut für analytische Chemie der Technischen Hochschule in Wien, ebenfalls in Graz einen Vortrag über das Thema: „Ringofentechnik, eine neue Methode in der Mikroanalyse".

Sehr erfolgreich verlief die Gedenkfeier und die Vortragstagung aus Anlaß der 100. Wiederkehr des Geburtstages von *F. Emich*, die auf Anregung von Prof. Dr. Ing. *G. Gorbach* und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemische Technologie der Technischen Hochschule Graz von der österreichischen Gesellschaft für Mikrochemie veranstaltet wurde. Bei der in der Zeit von 12. bis 15. Oktober 1960 in Graz abgehaltenen Tagung wurden folgende Vorträge gehalten: *F. Feigl* (Rio de Janeiro) und *V. Anger* (Wien): „Nachweis und Unterscheidung von isomeren organischen Verbindungen mit Hilfe der Tüpfelreaktionen"; *F. Schwarz-Bergkampf* (Leoben): „Ionentrennung auf Filterpapierstreifen"; *A. Lacourt* (Bruxelles): „Spectrophotometrie sur papier de traces de zinc"; *E. Hayek* (Innsbruck): „Papierchromatographische Verfolgung anorganischer Ionenreaktionen"; *P. E. Wenger* und *I. Kapetanidis* (Genève): „Nouvelle méthode de séparation du thorium d'avec les terres rares"; *R. Fischer* (Graz): „Die Analyse von binären Flüssigkeitsgemischen und Lösungen mit Hilfe der kritischen Mischungstemperatur"; *G. Hansen* (Oberkochen/Württ.): „Energetische Grenzen der Mikro-Spektralphotometrie"; *G. Kainz* und *H. Horwatitsch* (Wien): „Über die Testung von Oxydationsschichten bei der Elementaranalyse"; *F. Canal* (Mailand): „Erfahrungen aus der organisch-mikroanalytischen Praxis"; *H. Malissa* (Wien): „Beiträge zur elektrometrischen Kohlenstoff- und Schwefelbestimmung im offenen Rohr"; *R. Püschel* und *H. Wittmann* (Graz): „Direkte Titration geringer Mengen von Orthophosphat und einige praktische Anwendungen"; *M. Rebek* (Graz): „Eine Mikromethode zur Bestimmung der Acidität von

Zellulosen" (mit Demonstrationen); *L. Rosenthaler* und *F. Lüdy-Tenger* (Bern): „Fällungen basischer Stoffe mit schwefelhaltigen anorganischen Anionen"; *G. Ackermann* (Freiberg/Sachsen) und *Cl. Alferi* (Freiberg): „Verwendung von Perlenreaktionen in der quantitativen Mikroanalyse"; *H. Junek* (Graz): „Mikrosynthesen radioaktiv markierter Fettsäuren"; *H. Weisz* und *L. J. Ottendorfer* (Wien): „Semiquantitative Bestimmung der Radioaktivität mit Hilfe des Ringofens"; *H. Spitzy* (Bad Hall): „Die extraktive radiometrische Titration"; *M. Reese* (Frankfurt/Main): „Aktivierungsanalytische Untersuchungen an Silicium"; *F. A. Pohl* (Frankfurt/Main): „Grundprinzipien hochempfindlicher Spurenanalysen"; *H. Ballczo* (Wien): „Über die Möglichkeit und Notwendigkeit der Empfindlichkeitssteigerung mikrochemischer Reaktionen" (Ultramikronachweis von Fluorid-, Sulfat- und Bleiionen); *W. Leithe* (Linz): „Über Magnesiumbestimmungen durch Atomarabsorptions-Flammenphotometrie"; *F. Schroll* (Wien): „Die Spurenanalyse mit Hilfe thermochemischer Reaktionen in der Emissionsspektrographie"; *S. Gomišček* (Ljubljana) und *H. Malissa* (Wien): „Einige Eigenschaften des Natrium- bzw. Ammoniumpyrrolidindithiocarbamates und deren Metallchelate".

Die Österreichische Gesellschaft für Mikrochemie legt besonderen Wert auf die Förderung wissenschaftlicher Arbeiten mikrochemischen Inhaltes und hat im Laufe der letzten 3 Jahre S 24000,— für Stipendien ausgegeben. Diese Stipendien wurden Dissertanten und jungen Chemikern auf Antrag des jeweiligen Dozenten gewährt. Für das laufende Jahr hat der Vorstand der Gesellschaft wieder einen Betrag von S 8000,— für diesen Zweck bereitgestellt.

Der Vorstand der Gesellschaft hat beschlossen, den F. Feigl-Preis 1960 an Herrn Dr. *V. Anger* in Würdigung seiner Arbeiten auf dem Gebiet der organischen Tüpfelanalyse zu verleihen.

Da der bisherige Präsident, Prof. Dr. *H. Lieb*, gebeten hatte, von seiner Wiederwahl abzusehen, wählte die Hauptversammlung Herrn Prof. Dr. Ing. *Hanns Malissa* einstimmig zum Präsidenten. Auf Vorschlag des neuen Präsidenten wählte die Hauptversammlung Herrn Prof. Dr. *H. Lieb*, dessen unermüdlicher Tätigkeit die Gesellschaft ihren Aufschwung und ihr Ansehen verdankt, zu ihrem ersten Ehrenpräsidenten.

Im Anschluß an die Hauptversammlung sprach Dr. *V. Anger* über „Einige Beispiele für die Heranziehung von Tüpfelreaktionen zur Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen" und Dr. *E. Asenbauer*, Institut für analytische Chemie der Technischen Hochschule Wien, über „Die Verwendung von Dithiocarbamaten zur mikrochemischen Arsenbestimmung".

Doz. Dr. *A. Holasek*, Sekretär

Die 3. Polnische Tagung für Emissionsspektralanalyse

findet vom 19. bis 23. September 1961 in Jelitkowo bei Gdingen statt. Die Themen sind: Allgemeine Spektralanalyse, Spektralanalyse der leitenden Stoffe, Spektralanalyse der nicht leitenden Stoffe, Lösungsspektralanalyse einschließlich der Flammenphotometrie, Röntgen- und Röntgenfluoreszenzspektralanalyse.

Auskünfte, Anmeldeformulare und Programme sind beim Geschäftsführer der Arbeitsgruppe für Spektroskopie und Kolorimetrie im VÖCh, Herrn Prof. Dipl.-Ing. *H. Svejda*, Wien IX, Währinger Straße 59, Tel. 33 06 86, erhältlich.

Das 4. Internationale Gaschromatographische Symposium

wird organisiert von der Fachgruppe „Analytische Chemie" der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der „Gas Chromatography Discussion Group under the auspices of The Hydrocarbon Research Group of the Institute of Petroleum" und ist die 41. Veranstaltung der Europäischen Föderation für Chemie-Ingenieur-Wesen. Das Symposium findet vom 13. bis 16. Juni 1962 in Hamburg statt.

Die Vorträge, die auf der Tagung gehalten werden, sollen ähnlich denen sein, die auf den vorhergehenden gaschromatographischen Symposien gehalten wurden. Sie werden in die Hauptgruppen unterteilt:

1. Theorie,
2. Apparate und Arbeitstechniken,
3. Anwendungen.

Diejenigen Vorträge, die sich mit den Arbeitstechniken und Anwendungen befassen, müssen neue Erkenntnisse zum Inhalt haben, um in das Programm aufgenommen zu werden.

Bei dieser Gelegenheit weisen wir darauf hin, daß die vorläufige Anmeldung zur Teilnahme bis 15. Mai 1961 bei der Gesellschaft Deutscher Chemiker eingegangen sein sollte. Eine frühzeitige Anmeldung ist für die Arbeiten des Organisationskomitees sehr wichtig und für die Versendung weiterer Informationen sowie der Einladung zur endgültigen Anmeldung notwendig.

Interessenten, die Vorträge auf dem Symposium halten bzw. an der Veranstaltung teilnehmen wollen, bitten wir, die notwendigen Anmeldeunterlagen umgehend anzufordern bei

Gesellschaft Deutscher Chemiker,
Dr. *W. Fritsche*,
Frankfurt (Main), Postfach 9075.

The Society for Analytical Chemistry

Ordinary Meeting

An Ordinary Meeting of the Midlands Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 7 p. m. on Tuesday, January 10th, 1961, in Lecture Room 133 of the Wolverhampton and Staffordshire College of Technology, Wulfruna Street, Wolverhampton. The Chair was taken by the Chairman of the Section, Dr. *S. H. Jenkins*, F. R. I. C., F. Inst. S. P.

The following paper was presented and discussed:

"Trace Analysis Using the Polarographic Technique", by Mrs. *B. Lamb*, B. Sc. (Evershed & Vignoles Ltd.).

A definition of the concentration levels to which the term "trace analysis" may be applied, was given, and methods of extending the sensitivity of the polarographic technique were briefly described. These fall naturally into two main groups: (a) instrumental; (b) electrochemical.

Under instrumental the use of the classical dropping mercury cathode together with the application of A. C. voltage, or single sweep cathode ray polarography was considered. Under (b) electrochemical, the use of other electrode systems, which may give a similar increase in sensitivity. These are the hanging drop electrode and the pool electrode and the vibrating platinum electrode.

This was followed by examples of amperometric titration, which enables trace analysis to be carried out with comparatively simple equipment using

the principles of polarography combined with classical analytical methods. A demonstration of a number of amperometric titrations was given to illustrate the applicability of this technique to different materials.

Annual General Meeting of the Western Section

The sixth Annual General Meeting of the Western Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 5.45 p. m. on Thursday, January 12th, 1961, at the University of Bristol. Dr. *G. V. James*, M. B. E., F. R. I. C., Chairman of the Section, was in the Chair.

The following Officers were elected for the forthcoming year:

Chairman: Dr. *G. V. James*, M. B. E., F. R. I. C.

Vice-Chairman: Dr. *F. H. Pollard.*

Hon. Secretary and Treasurer: Dr. *T. G. Morris*, B. Sc., A. R. C. S., D. I. C., A. R. I. C., Brockleigh, Clevedon Avenue, Sully, Glamorgan.

The Annual General Meeting was followed by a Joint Meeting with the Bristol and District Section of the Royal Institute of Chemistry at which the Chair was taken by the Chairman of the Bristol and District Section, Dr. *R. Woodcock*, F. R. I. C. The following paper was presented and discussed: "The Analysis of Plastics", by *J. Haslam*, D. Sc., F. R. I. C.

Annual General Meeting of the Scottish Section

The 26th Annual General Meeting of the Scottish Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 6.30 p. m. on Thursday, 26th January, 1961 at the Grosvenor Restaurant, 72, Gordon Street, Glasgow, C. 1., under the Chairmanship of Mr. *A. N. Harrow*, A. H-W. C., F. R. I. C.

The following were elected Officers of the Section for the forthcoming year:

Chairman: Mr. *A. F. Williams*, B. Sc., F. R. I. C.

Vice-Chairman: Dr. *R. A. Chalmers*, B. Sc.

Hon. Secretary and Treasurer: Mr. *J. Brooks*, M. A., A. R. I. C., Research and Development Department, Imperial Chemical Industries Ltd., Nobel Division, Stevenston, Ayrshire.

The Annual General Meeting was followed by an Ordinary Meeting of the Section at which the following paper was presented and discussed:

"Chemical Research in the Electricity Supply Industry", by *J. M. Ward*, B. Sc., F. R. I. C. (Head of Chemistry Division, Central Electricity Research Laboratories, Leatherhead, Surrey).

Annual General Meeting of the North of England Section

The thirty-sixth Annual General Meeting of the North of England Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 2.15 p. m. on Saturday, January 28th, 1961, at the "Nag's Head Hotel", Lloyd Street, Manchester. The Chairman of the Section, Dr. *J. R. Edisbury*, presided.

The following were elected Officers of the Section for the forthcoming year:

Chairman: Mr. *J. Markland*, B. Sc., F. R. I. C.

Vice-Chairman: Mr. *C. J. House*, B. Sc., A. R. C. S., F. R. I. C.

Hon. Secretary and Treasurer: Mr. *B. Hulme*, B. Sc., F. R. I. C., Ch. Goldrei, Foucard & Son Ltd., Brookfield Drive, Liverpool, 9.

The Annual General Meeting was followed by an Ordinary Meeting of the Section when Dr. *J. R. Edisbury* gave his "Retiring Chairman's Address".

Ordinary Meeting

An Ordinary Meeting of the Society was held at 7 p. m. on Wednesday, February 1st, 1961, in the Meeting Room of The Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London, W. 1.

The Chair was taken by the President, Mr. *R. C. Chirnside*, F. R. I. C.

The subject of the meeting was "X-ray Fluorescence", and the following papers were presented and discussed.

"X-ray Fluorescent Spectroscopy", by *K. M. Bills* (Mond Nickel Co. Ltd., Birmingham).

No other physical method of analysis has made an immediate impact comparable with that of X-ray fluorescence spectroscopy.

Three or four years ago this technique was virtually unknown; to-day it is fast becoming a serious rival of the direct-reading emission spectrometer.

The principles, scope and limitations of the technique were described and illustrated by analytical applications from the author's laboratory.

"Some Analytical Applications of X-ray Fluorescence Spectrometry", by *F. Brown*, B. Sc., Ph. D., A. R. I. C. (I. C. I. Ltd., Billingham Division, Billingham).

As an introduction, the important features of the Philips equipment, which included a total-vacuum spectrograph, in use at Billingham were described. Details of an investigation to determine the efficiency of using intensity ratios, rather than line intensities, for routine analysis were given. The results show that the need for frequent re-calibration can be avoided using the ratio method because of the degree of compensation for instrumental variations which is obtained. Selected applications of X-ray fluorescence analysis which involved various methods of specimen preparation were described; the analysis of photographic film, rubber, fertilizers, caustic liquor, metallurgical samples, catalysts and the determination of lead in the atmosphere were discussed. Problems due to absorption may be serious and two types were illustrated. The use of an internal standard and, particularly, matrix dilution with borax have been found to be extremely useful for overcoming absorption effects; some examples were given. It has been found that the precision and speed of routine analysis by X-ray fluorescence in many cases compare favourably with classical methods.

Ordinary Meeting

An Ordinary Meeting of the Biological Methods Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 7 p. m. on Wednesday, February 15th, 1961, in the Meeting Room of the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, W. 1. The Chair was taken by the Hon. Assistant Secretary of the Society, Mr. *S. A. Price*, B. Sc., F. R. I. C.

The following paper was presented and discussed:

"The Use of Enzymes in Analysis", by *C. J. Threlfall*, B. Sc. (M. R. C. Toxicology Research Unit, Carshalton).

In the last decade, the recognition and isolation of enzymes in relatively pure form together with their increasing availability from commercial sources, has led to a more widespread realisation of their value as analytical reagents. Their advantages in specificity, speed of operation and sensitivity was discussed as well as some of the difficulties.

Examples of the three main types of analysis, measurement of change in substrate and product concentration, measurement of reaction rate and the activation and inactivation of an enzymic reaction was elaborated and a comparison of enzymic and chemical determinations of some compounds presented.

Annual General Meeting of the Microchemistry Group

The seventeenth Annual General Meeting of the Microchemistry Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 6.45 p. m. on Friday, February 24th, 1961, at the Chemical Society, Burlington House, Piccadilly, London, W. 1. The Chair was taken by the Chairman of the Group, Mr. *F. Holmes*, B. Sc., A. R. I. C.

The following were elected Officers of the Group for the forthcoming year:

Chairman: Mr. *C. Whalley.*
Vice-Chairman: Miss *M. Corner.*
Honorary Secretary: Mr. *D. W. Wilson*, Sir John Cass College, Jewry Street, Aldgate, London, E. C. 3.
Honorary Treasurer: Mr. *G. Ingram.*

The Annual General Meeting was followed by an Ordinary Meeting of the Group at which the Chair was taken by the new Chairman of the Group, Mr. *C. Whalley*, B. Sc., F. R. I. C. The retiring Chairman, Mr. *F. Holmes*, B. Sc., A. R. I. C., gave a lecture on "The Determination of Metals by Organic Reagents".

Joint Meeting

A Joint Meeting of the Scottish Section of the Society for Analytical Chemistry with the Glasgow and West of Scotland Section of the Royal Institute of Chemistry was held at 7.15 p. m. on Friday, February 24th, 1961, in the Royal College of Science and Technology, George Street, Glasgow, C. 1. The Chair was taken by the Chairman of the Scottish Section, Mr. *A. F. Williams*, B. Sc., F. R. I. C.

The following papers were presented and discussed:

"Applications of Ion-Exchange in Inorganic Analytical Chemistry", by *R. A. Wells*, B. Sc., F. R. I. C., M. I. M. M. (National Chem. Lab., Teddington, Middx.).

Fundamental properties of ion-exchangers, ion-exchange equilibria and ion-exchange kinetics were discussed in the context of inorganic analytical chemistry. The various ways in which the inorganic analyst may employ ion-exchange were illustrated with examples. Possible further extensions of the use of ion-exchange in analytical chemistry were proposed with particular reference to the use of modified cellulose exchangers, liquid ion-exchangers, ion-exchange membranes and selective resins.

"Ion-Exchange in the Electroplating Industry", by *V. E. Gripp*, B. Sc., A. R. C. S., A. R. I. C. (Permutit Ltd., London).

The elementary principles of ion exchange were discussed together with a brief review of their historical development and their use in large scale plants for the purposes of water treatment etc. This industrial usage of the ion exchange processes were further amplified by reference to specific applications in the electroplating industry. The process has found extensive

practical use in the metal finishing trade from two entirely different standpoints namely the purification of metal treatment liquors, e. g., chrome anodising baths and also a means of decontaminating the emergent swill waters from metal finishing shops. The purification of electroplating solutions represents an important economic advantage which has been well proved in practice and this theme was amplified by reference to several specific cases when it was hoped to convey an idea of the scale upon which they are practised. The treatment of dilute swill waters from e. g. chromium plating processes, enables several advantages to be gained at the same time by using a demineralising technique. Water is largely recovered in a purified condition for re-use and the capital cost of effluent treatment is greatly reduced because the volume of the plant outflow is drastically curtailed. Several particular points of technical interest arise during the consideration of swill water treatment and were enlarged upon during this lecture.

Ordinary Meeting

The 75th Ordinary Meeting of the Physical Methods Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 6 p. m. on Tuesday, February 28th, 1961, in the Cuthbert Wallace Lecture Room, Royal College of Surgeons of England, Lincoln's Inn Fields, London, W. C. 2. The Chair was taken by the Chairman of the Section, Dr. *G. W. C. Milner*, F. R. I. C., A. Inst. P.

The subject of the meeting was "Physical Methods of Analysis used in Medical Research", and the following papers were presented and discussed:

"Gas Chromatography and Anaesthetic Research", by *D. W. Hill*, M. Sc., A. Inst. P., A. M. I. E. E. (Research Department of Anaesthetics, Royal College of Surgeons of England).

The outstanding advantage of gas chromatography in anaesthetic and respiratory research lies in its versatility. The lecturer concentrated on the various techniques which have been employed rather than on the applications.

In anaesthetic research, in particular, one is faced with the need to analyse a considerable variety of gases and vapours. These include oxygen, nitrogen, carbon dioxide, nitrous oxide, cyclopropane, di-ethyl ether, halothane, chloroform, trichloroethylene and methoxyfluorane.

Using packed columns the anaesthetic vapours are separated on a short dinonyl phthalate on firebrick column run at 80° C. In parallel with this is run a twenty foot column of dimethyl sulphoxide on firebrick at room temperature to separate oxygen, nitrous oxide and carbon dioxide. An electrically driven sampling valve is employed.

In addition to the use of packed columns an experimental capillary column gas chromatograph with a cathode ray tube display was described.

The flame ionisation detector has been extensively used by Dr. *Butler* of the Research Department of Anaesthetics for the analysis of anaesthetic concentrations in whole blood. This technique offers considerable promise for use in pharmacological investigations.

"The Measurement of the Oxygen Tension of Blood Using a Covered Platinum Electrode", by *J. M. Bishop*, M. D., M. R. C. P. (Department of Medicine, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham).

The measurement of the oxygen tension of blood has considerable value in physiological studies. Due to the shape of the oxyhaemoglobin dissociation

curve, the oxygen tension is a more precise measure of the state of oxygenation of arterial blood in normal subjects, and deviations from the normal in disease are more readily detected. The oxygen tension of venous blood may be of importance in the study of the metabolism of a region of the body.

Estimation of oxygen tension indirectly from the dissociation curve is inaccurate for the arterial blood of normal subjects. The microtonometer method of *Riley* is a difficult technique and is not suitable for tensions greater than 90 mm Hg. Polarographic measurement therefore offers many advantages, providing a direct estimate and theoretically being suitable for all oxygen tensions.

Unfortunately many complicating factors arise and for a long time were not satisfactorily overcome. The dropping mercury electrode is unpredictably influenced by the presence of red cells, so that estimates have to be made on separated plasma. Bare platinum electrodes are similarly affected and when covered with cellophane or agar they are still sensitive to variations in p_H. The polyethylene covered, combined electrode of Clark represents an important advance overcoming most of these difficulties. An instrument employing this type of electrode was described together with the results of tonometer experiments to establish its accuracy and reliability.

"Application of Infra-Red Spectroscopy to Some Problems of Medical Science", by *A. E. Kellie*, B. Sc., Ph. D., A. R. I. C. (Courtauld Institute of Biochemistry, Middlesex Hospital Medical School).

For the development of a practical infrared spectrometer in the early forties we are largely indebted to the recognition of the value of infrared spectroscopy in the oil industry. During the following decades improvements in instrumental performance as a result of developing techniques–double-beam operations, multiple pass systems, gratings and grating replicas as well as improvements in detector response, have kept the field in a state of continuous change, yet almost from the outset the uniqueness of the steroid series as a medium for the application of infrared spectroscopic techniques was appreciated and under the direction of the late Dr. *Dobriner* spectroscopic methods have been applied with outstanding success to the study of the metabolism of endogenous steroid hormones.

In the animal kingdom, many somatic cells possess the ability to biosynthesise cholesterol which can be considered as a major precursor of the animal steroid hormones. Steroids of the pregnane (C_{21}), androstane (C_{19}) and oestrane (C_{18}) series formed in the endocrine glands-adrenal cortex, placenta ovary and testes-are secreted into the blood system which carries them round the body to centres of biological action. They exert their influence on the metabolic processes of the body excercising control over carbohydrate metabolism (gluco-corticosteroids), electrolyte balance (mineralo-corticosteroids), the development of secondary sex characteristic in males (androgens) and females (oestrogens) and are responsible for changes which are essential to the maintenance of pregnancy (progestins). The survival of these biologically active compounds in the blood stream as measurered by their biological half-life is short and they undergo multiple changes leading to the formation of many new compounds which are eventually excreted as a complex mixture in the urine. By reference to specific examples it was hoped to illustrate how chromatographic techniques used in conjunction with infrared spectroscopy contributed largely to the formidable task of separating and identifying the components of this mixture.

The application of infrared methods to other problems of medical biochemistry has been less striking. The failure to make equal progress in these fields was used to illustrate the limitations and difficulties of the method.

The meeting was preceded at 3.15 p. m. by a visit to the Research Departments of the Royal College of Surgeons of England, Lincoln's Inn Fields.

General Meeting of the Society

The eighty-seventh Annual General Meeting of the Society was held on Friday, March 3rd, 1961, in The Meeting Room of the Royal Society, Burlington House, London, W. 1, with the President, Mr. *R. C. Chirnside*, F. R. I. C., in the Chair. The Financial Statement and the Report of the Council for the past year were submitted and approved, and the Auditors were appointed.

Summary of Annual Report

Judged even against the records set in recent years, 1960 has been particularly full of varied activities. Fifty one meetings of Sections and Groups were held, many jointly with other organisations; this equals last year's record. There have been 10 meetings of the Society, 2 more than last year, and these included joint Symposia with the Fertiliser Society, on "Fertiliser Analysis", with the Iron and Steel Institute and the Institute of Metals, on "The Determination of Gases in Metals", both in London. The Society played a prominent part in the Third Gas Chromatography Symposium held in Edinburgh last June; this was organised jointly by the Society and the Gas Chromatography Discussion Group of the Hydrocarbon Research Group of the Institute of Petroleum. Attendances at these 3 Symposia were 200, 300 and over 560, respectively. The admission of 133 new members during the year exceeded losses by deaths and resignations to raise the total membership of the Society by 57 to 1,998.

Among the activities of the Sections and Groups were a 2-day Symposium on "Analytical Chemistry in the Service of Agriculture", organised by the Midlands Section and held in Nottingham, and a joint meeting of the Scottish Section, the Polarographic Society and the Caithness Technical Society held at Dounreay.

The Analytical Methods Committee published 8 reports during the year, including 2 on investigations carried out specially for the Committee. One new Sub-Committee has been appointed. It is working on primary analytical standards, and was set up in response to a request from the Analytical Chemistry Section of the International Union of Pure and Applied Chemistry; its task is to examine critically the various substances proposed as standards with a view to making specific recommendations on behalf on the United Kingdom. Among other subjects on which work is proceeding are Additives in Animal Feeding Stuffs, Trace Elements in Fertilisers and Feeding Stuffs, and, jointly with the Pharmaceutical Society, on methods of assay of crude drugs.

The Honorary Treasurer has reported increases both in income and expenditure. Although costs rose more than income, therewas still a surplus of income over expenditure, although it was less than last year.

The Analyst and *Analytical Abstracts* have continued to grow, both establishing new records for size and circulation; a monthly printing or 6.600 for the former proved just adequate to meet demands, but 6.800 for the latter led to stocks becoming exhausted by the end of 1960. For 1961, the numbers of copies printed has been raised to 6.900 and 7.400, respectively.

Election of Officers

The following Officers and Members of Council were elected for the forthcoming year. President: *A. J. Amos*; Past Presidents serving on the Council: *R. C. Chirnside*, *J. H. Hamence*, *D. W. Kent-Jones*, *K. A. Williams*; Vice-Presidents: *A. L. Bacharach*, *J. R. Edisbury*, *F. C. J. Poulton*; Honorary Treasurer: *D. T. Lewis*; Honorary Secretary: *R. E. Stuckey*; Honorary Assistant Secretaries: *C. A. Johnson* (Programmes Secretary), *S. A. Price*.

Other Members of Council: *D. M. W. Anderson*, *B. Bagshawe*, *E. Bishop*, *S. G. Burgess*, *R. A. Chalmers*, *D. C. Garratt*, *E. Q. Laws*, *S. H. Jenkins*, *W. M. Lewis*, *C. A. Parker*, *D. W. Wilson*, and *J. T. Yardley*.

Ex-Officio Members: *J. Markland* (Chairman of the North of England Section), *A. F. Williams* (Chairman of the Scottish Section), *G. V. James* (Chairman of the Western Section), *H. C. Smith* (Chairman-elect of the Midlands Section), *C. Whalley* (Chairman of the Microchemistry Group), *G. W. C. Milner* (Chairman of the Physical Methods Group), and *J. S. Simpson* (Chairman of the Biological Methods Group).

Address of the Retiring President

After the Annual General Meeting, Dr. *Amos* took the Chair and Mr. *Chirnside* delivered his Presidential Address, entitled

The Enlargement of Horizons in Analytical Chemistry

It was just 50 years since the President, Mr. *E. W. Voelcker*, in speaking of the incorporation of the Society to embrace all branches of the analytical profession, had referred to "the enlargement of our horizons". Since then the Society had greatly expanded its membership, its Journal and its activities. In spite of these achievements, he thought there was much more to do in the near future, for while the Society had been "catching up", analytical chemistry itself had not stood still.

In the golden age of analysis in the last century the composition of much that went to make up the material world had been charted. Later the emphasis had shifted to the control of materials by analysis, an objective no longer so unambiguously scientific, and there had been some lowering of the status of analysis and of the analyst.

In seeking to provide a professional analytical service in the environment of industrial research, he had found it necessary to develop a new and a wider conception of what constituted analytical chemistry. The analyst had to enlarge his knowledge so as to be able to comprehend his customers' problems. Without this he might fail to satisfy those who sought his aid. Some of the major advances in analytical techniques and tools in the last 20 years had come not from analysts but from those who wanted information outside the conventions of the analyst. There were many today, chemists, physicists, biochemists, vitally engaged in what were truly analytical problems, who would not admit to the practice of analysis and would reject the label analyst.

The distinction between testing and analysis, sometimes obscured in the past, often became clearer with the development of automatic equipment, some of which gave conventional information in a sensationally short time. Some other instrumental techniques provided entirely new kinds of information, all of which were vital to the study and understanding of materials in the newer applications for which they were required. This was particularly true of the solid state.

Since 1945 the Society had done much through its Groups to meet the changing situation. But there were now a number of other bodies concerned with specialised techniques and measurements, whose loyalties lay well outside the bounds of the Society. There was a challenge here to the Society and to the analyst to establish closer contacts with those working in these other disciplines to set up a stronger mechanism for collaboration and to prepare to bridge over the period of transition from classical analytical chemistry to analysis based more broadly on the newer techniques of measurement and of the measurement of many qualities and quantities over and above those of chemical composition.

Some of the chemistry was going out of analytical chemistry, and this raised problems, not only for the industrial analyst, but also for the analytical interests of the Universities and the Colleges of Technology. Microchemistry, too, as conventionally defined, would have to take note of the newer techniques of electron diffraction and the electron micro-probe, for example. By means of these it was now possible to make a point to point analysis over minute areas of specimen, often non-destructively. Such information might prove to be of inestimable value, greater by far than the average figures obtained on relatively large samples. This was already true of solid state devices such as the semiconductors. It must surely be applicable to both the metallurgical and the biochemical fields of work.

The next 30 years, it could be confidently predicted, would see some radical changes in "analytical chemistry". He thought the Society would have "to enlarge its horizons" to an extent never dreamt of by *Voelcker* in 1912.

Anniversary Dinner

In the evening following the Annual General Meeting, a Dinner to celebrate the eighty-seventh anniversary of the Society was held, by kind permission of the Prime Warden, Wardens and Court of Assistants of the Worshipful Company of Fishmongers, at Fishmongers' Hall, London Bridge. The members and guests, numbering 153, were received by the President, Mr. *R. C. Chirnside*, F. R. I. C., and Mrs. *Chirnside*. The President afterwards took the Chair at the Dinner.

The Guests of the Society and of the President included *The Lord Fleck*, K. B. E., F. R. S. (President of The Society of Chemical Industry); *E. Le Q. Herbert*, Esq., B. Sc., F. H.-W. C., F. R. I. C., M. I. Chem. E., F. Inst. P., F. Inst. F. (President of The Royal Institute of Chemistry) and Mrs. *Herbert*; Sir *Harry Jephcott*, M. Sc., F. R. I. C., F. P. S., Barrister-at-Law (Chairman of the Council for Scientific and Industrial Research) and Lady *Jephcott*; Sir *Charles F. Goodeve*, O. B. E., F. R. S. (Director of the British Iron and Steel Research Association) and Lady *Goodeve*; *G. L. Bailey*, Esq., C. B. E., M. Sc. (Director of the British Non-Ferrous Metals Research Association) and Mrs. *Bailey*; *O. W. Humphreys*, Esq., C. B. E., B. Sc., F. Inst. P., M. I. E. E., F. R. Ae. S. (Technical Director of The General Electric Co. Ltd.) and Mrs. *Humphreys*; *A. T. James*, Esq., B. Sc., Ph. D. (Chairman of The Gas Chromatography Discussion Group of the Hydrocarbon Research Group of The Institute of Petroleum) and Mrs. *James*; *J. H. Hamence*, Esq., M. Sc., Ph. D., F. R. I. C. (President of The Association of Public Analysts); and *F. A. Pester*, Esq. (representing the Worshipful Company of Fishmongers) and Mrs. *Pester*.

The Loyal Toast was proposed by the President.

Lord *Fleck* proposed the Toast of the Society. After referring to the long and arduous work involved in analysis as he had carried it out at the beginning of his career, he spoke of the rapidity of modern methods. As these were developed, the responsibility of the Society became even greater. Analysis had started with titrations carried out in teaspoonfuls; new silicon, for example, could be determined at 10^{-4} parts per million by instrumental methods. Analysis was the basis of all scientific work, and industry was indebted to the Society for its work for science, and analysis in particular. The Toast was coupled with the name of the President.

Mr. *Chirnside* replied, paying tribute to Lord *Fleck* as Chairman of the Committees that produced so rapidly the reports on Coal and the Fishing Industry. But this work had been additional to his Chairmanship of a great Company that believed in analysis, nurturing in each of its Divisions some of the most outstanding analysts in the country. The Billingham Division had done much to pioneer gas chromatography. He referred to the special meetings held by the Society during the year, first that with the Iron & Steel Institute and the Institute of Metals, and then the Gas Chromatography Symposium in Edinburgh; it was particularly pleasing that Sir *Charles Goodeve* and Mr. *Bailey*, representing the Metallurgical interests, and Dr. *James*, Chairman of the Gas Chromatography Discussion Group of the Hydrocarbon Research Group of the Institute of Petroleum were present as guests.

Dr. *Amos* proposed the Toast of the Guests. He said that Lord *Fleck*, on retiring from the Chairmanship of I. C. I., might have decided on a period of relaxation, but this was not so; he had become President of the Society of Chemical Industry and Treasurer of the Royal Society. His services to the country had already been mentioned by the President. He wished success to Mr. *Herbert*, completing shortly his term of office as President of the Royal Institute of Chemistry. He recalled how, despite some hostility between the Society and the Institute in its very early days, the Society being 2 years older, union of the two had been favoured, at least by the Presidents, in 1899. The Institute now had it its care 16000 chemists. Dr. *Hamence* had been host 2 years ago, and was now a guest as the President of the Association of Public Analysts. Sir *Harry Jephcott* he particularly welcomed, for last year he had completed 40 years' membership of the Society and was now a life member. He recalled how, in 1915, the Society had taken part in a deputation that had urged the setting up of a council for science, which had materialised as the Department of Scientific and Industrial Research, of which Sir *Harry* was Chairman. Mr. *Humphreys*, Director of the General Electric Company's Hirst Research Centre, was a physicist, and very well alive to the potentialities and requirements of analytical chemistry. The President had been particularly keen to have the Metallurgical Institutes represented, and by inviting the Presidents of the Research Associations the Society had as welcome guests Sir *Charles Goodeve*, President-elect of the Iron & Steel Institute, and Mr. *Bailey*, immediate Past President of the Institute of Metals. He was glad to have Dr. *James* present, as a reminder of the highly successful Symposium held last year. A special guest was Mr. *Pester*, Clerk to the Worshipful Company of Fishmongers, who he asked to express to the Court of Assistants the Society's appreciation for being allowed to dine in their beautiful Hall, for which special dispensation had been granted. Finally, he welcomed all the ladies, lending colour and gaiety to this occasion.

Mr. *Herbert* replied, saying that the association of the Society with the Royal Institute of Chemistry was so close that, as he looked at the list of guests and saw how many Fellows or Associates were present, he began to wonder if he was attending a dinner of his own Institute. Being a President meant a lot of work and a lot of fun; perhaps the most hazardous job was attending dinners, with its attendant liability to being called upon to speak.

The President concluded the proceedings by calling upon Dr. *Amos*, the new President, who had served the Society so well as Honorary Treasurer, and invested him with the Presidential Badge, wishing him a successful term of office. Dr. *Amos* expressed his pleasure at the honour, and presented Mr. *Chirnside* with a replica of the Society's Badge to wear as Past President.

Annual General Meeting of the Midlands Section

The sixth Annual General Meeting of the Midlands Section of the Society for Analytical Chemistry was held at 6.30 p. m., on Tuesday, March 14th, 1961, at Regent House, St. Philip's Place, Birmingham, 3. The Chair was taken by the Chairman of the Section, *S. H. Jenkins*, Ph. D., D. Sc., F. R. I. C., F. Inst. S. P.

The following were elected Officers of the Section for the forthcoming year:

Chairman: Dr. *H. C. Smith.*

Vice-Chairman: Mr. *W. H. Stephenson.*

Honorary Secretary: Mr. *G. W. Cherry*, 48 George Frederick Road, Sutton Coldfield, Warwicks.

Hon. Treasurer: Mr. *F. C. J. Poulton.*

Hon. Asst. Secretary: Mr. *R. Adkins.*

At the conclusion of the business of the Annual General Meeting, Dr. *H. Weisz* gave a short talk on "Advances in the Use of the Ring Oven Technique".

Report of Ordinary Meeting

An Ordinary Meeting of the Midlands Section was held at 7 p. m. on Thursday, March 23rd, 1961, at the College of Technology, Burton Street, Nottingham. The Chair was taken by Dr. *S. H. Jenkins*, D. Sc., F. R. I. C., F. Inst. S. P., past Chairman of the Section. The following paper was presented and discussed:

"The Measurement of p_H and Electrode Potential for Analytical Purposes", by *G. Mattock*, B. Sc., Ph. D., A. R. I. C. (Electronic Instruments Ltd.).

The theoretical limitations and uncertainties of p_H determinations in various media were considered, together with the general behaviour of glass electrodes and the effect of temperature. Reference was made to apparatus now available for measuring the p_H of small volumes down to 60–80 μl.

The use of various electrode systems for redox titrations and for titrations in non-aqueous solutions were discussed. Mention was made of a mercury–Hg(E. D. T. A.) combination which acts as an indicator electrode in potentiometric E. D. T. A. titrations. By suitable choice of p_H conditions this enables groups of metals to be selectively titrated, e. g. in water hardness determinations.

Recently developed glass electrodes which are highly selective to singly charged cations, e. g. Sodium, were discussed. These give, for example,

a "pNa" value and their measuring range extends from molar to 10^{-5} molar (0.2 p. p. m. Na^+), or even to 10^{-6} molar with certain controls. It has been observed that these electrodes are also sensitive to other univalent ions, e. g. silver and thallium-I.

Report of Ordinary Meeting

An Ordinary Meeting of the Scottish Section was held at 7.15 p. m. on Friday, March 24th, 1961, in the Royal College of Science and Technology, George Street, Glasgow, C. 1. The Chair was taken by Mr. *A. F. Williams*, B. Sc., F. R. I. C., Chairman of the Section. The following papers were presented:

"The Titration of Weak Acids in Non-Aqueous Solvents", by *G. R. Jamieson*, B. Sc., F. R. I. C. (Chemistry Department, Paisley Technical College, Paisley, Renfrewshire).

The titration in non-aqueous solvents of weak acids of different types were discussed and a comparison made of potentiometric methods using various electrode combinations in different solvent systems. The usefulness of non-aqueous titrations for differentiating acids in mixtures were illustrated.

"High Frequency End-point Detection in non-aqueous Titrimetry", by *E. S. Lane*, B. Sc., Ph. D., F. R. I. C. (Atomic Energy Research Establishment, U. K. A. E. A., Harwell, Berkshire).

A review was given of the systems for which high-frequency titrimetry is most appropriate, and also a brief account of recent instrumentation.

Report of Joint Meeting

A joint meeting of the North of England Section and Physical Methods Group of the Society for Analytical Chemistry was held at 2.15 p. m. on Saturday, 25th March, 1961, at the City Laboratories, Mount Pleasant, Liverpool, 3. The Chair was taken by the Chairman of the North of England Section, Mr. *J. Markland*, B. Sc., F. R. I. C.

The subject of the meeting was "The Analysis of Intact Samples", and the following papers were presented and discussed:

"X-ray Fluorescence in General Analysis", by *D. E. Bromley*, B. Sc., A. Inst. P. (Admiralty Materials Laboratory, Holton Heath).

X-ray Fluorescence spectroscopy is widely applicable, gives good accuracy and is quick and non-destructive, but there are difficulties with light elements, there is only moderate sensitivity and apparatus tends to be expensive. Attention has concentrated on repetition analysis, but X-ray fluorescence can be useful in more general work. Focussing curved crystal spectrometers having good resolution requiring only a small specimen have been made at Admiralty Materials Laboratory. One of these is of very simple construction, requiring only hand tools and a drill to make. A typical application is in the analysis of artificial rubies for chromium. A satisfactory calibration was made using mixtures of powdered oxides and a limiting sensitivity of 40 p. p. m. was obtained. In the measurement of plating thickness, using radiation from either the grating or the underlying metal, an approximate calibration depending on known absorption coefficient is possible.

"The Use of Radioactive Isotopes in Simple X-ray Fluorescence Analysis", by *C. E. Mellish*, B. A., D. Phil. (U. K. A. E. A., Wantage).

For many applications of X-ray fluorescence spectroscopy the full performance of the conventional spectrometer is not required. In these applications it is possible to substitute a small radioactive source ($\sim$ 1 millicurie) for the X-ray tube, provided that the crystal spectrometer is also dispensed with and resolution of the fluorescent X-rays produced is performed in a proportion or scintillation counter. Results were given of the application of the simple system to such problems as the measurement of metal plate thickness and of solution strengths. The suitability of different isotope sources for different applications was discussed.

"Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Techniques", by *D. J. Ferrett*, M. A., D. Phil. (U. K. A. E. A., Harwell).

The phenomenon of nuclear magnetic resonance, in which responses can be obtained from nuclei that have spin, offers a technique for the analysis of intact samples of solids, liquids and gases. Equipment demands are rigorous, e. g. magnets with highly uniform fields and electronic circuits with low noise levels. The information obtained can be both qualitative and quantitative and can be used as an aid to the elucidation of the structure of complex organic molecules.

Report of Joint Meeting

A Joint Meeting of the Society for Analytical Chemistry with the Oil and Colour Chemists Association was held at 7 p. m. on Wednesday, April 12th, 1961, at the Wellcome Building, Euston Road, London, N. W. 1. The Chair was taken jointly by the President of the Society, Dr. *A. J. Amos*, F. R. I. C., and the Chairman of the London Section of the Oil and Colour Chemists Association, Mr. *J. A. L. Hawkey*.

The following papers were presented and discussed:

"Some Problems in the Analysis of Surface Coating Materials", by *C. Whalley*, B. Sc., F. R. I. C. (Laporte Chemicals Ltd., Luton).

During the last fifteen years the many and varied developments in the composition and formulation of surface coatings have confronted the analytical chemist with a number of very difficult problems, many of which are still only capable of a partial solution. The introduction of physical techniques, e. g. gas chromatography, X-ray fluorescence and infra-red spectroscopy has helped to provide information about the nature of the coating composition, before and after application.

The way in which some of the analytical difficulties have been overcome were illustrated by examples drawn from the main types of surface coating compositions, oleo-resinous paints, emulsion paints and lacquers. The part played by purely chemical analysis in the characterisation of surface coating compositions must not be overlooked since much useful information can be obtained by this means.

The part played by the analytical chemist in the Oil and Colour Industry should be appreciated and the best use made of his knowledge and experience.

"The Examination of Mixed Solvents Obtained from Plastic Adhesives, Lacquers and Surface Coating Preparations", by *J. Haslam*, D. Sc., F. R. I. C., *A. R. Jeffs* and *H. A. Willis*, B. Sc. (I. C. I. Ltd., Plastics Division, Welwyn Garden City).

Early work on this subject was reviewed and the isolation of the mixed solvent was described. Examples were given (a) of the separation of mixed solvents on stationary phases of different character and (b) the use of the elution data obtained in solvent identification. Finally gas liquid chromatographic separation followed by infra-red examination of the isolated solvents was described in detail.

"The Identification and Estimation of Pigments in Pigmented Compositions by Reflectance Spectrophotometry", by *D. R. Duncan*, Ph. D., B. Sc. (Paint Research Station, Teddington).

A method has been developed for the identification and approximate determination of the coloured pigments in pigmented compositions by a simple mathematical analysis of the form of their spectrophotometric reflectance curves. The method is particularly suitable for the analysis of materials pigmented with a white pigment tinted with coloured pigments, for which ϑ $(= R/2 + 1/2\,R - 1$; see J. Oil Col. Chem. Assoc. 1949, 32, No. 349, 302) is an additive function of the coefficients of absorption of the pigments present. If the values of the coefficients of absorption used in the calculation are those relating to the particular samples of pigment in use by the analyst's organisation, the analytical results will give the proportions of these samples of pigments (possibly of different tinting strength) actually used in its manufacture. Where the object is to produce a match, this is an advantage.

The method has given satisfactory results with paints and plastics, and should be applicable to other pigmented compositions such as printing inks, linoleum, pigmented paper, coloured concrete, etc., and also to the identification of the dyes in dyed textiles, to which the above formula would be expected to apply.

Société de Chimie Industrielle

Groupe de la Chimie Analytique

Compte rendu de la séance du mercredi 8 Février 1961

La séance est ouverte à 17 h 30 sous la présidence de notre Vice-Président, M. *L. Roger*, remplaçant M. *C. Duval*, retenu par une réunion du Centre de Documentation du C. N. R. S.

M. *L. Roger* donne la parole à M. *Georges Riedinger*, Ingénieur au Centre de Recherches de Saint-Gobain, qui expose un travail mis au point avec *L. Carette* et *M. Jombar*, sur le «*Dosage de l'eau par la méthode de Karl Fischer*». M. *Riedinger* rappelle tout d'abord le principe de la méthode et le processus habituellement suivi et fait remarquer que l'usage a prouvé que la principale cause d'erreur du dosage provenait de la contamination des récipients et des réactifs par l'humidité atmosphérique. Il propose donc un dispositif original d'introduction de l'échantillon dans la cellule, *à l'abri de l'air, après* balayage de cette cellule par de l'azote séché sur anhydride phosphorique, afin d'éviter la dessication prématurée de l'échantillon par le courant d'azote.

Les différences entre les résultats avec ou sans balayage montrent l'importance de l'humidité de l'air ambiant. Les écarts atteignent 0,3 ml de solution Methanol-eau, soit pour une solution ME à 3 mg × ml, environ 1 mg d'eau. En ce qui concerne le mode opératoire, le titrage indirect a été choisi: on verse en une seule fois un excès de liqueur KF, et l'on titre cet excès en retour avec la solution ME d'eau dans le méthanol. Ce mode de titrage ne présente qu'une difficulté, qui n'est d'ailleurs pas très grande, celle de la détermination du titre en eau de la solution de ME. M. *Riedinger* envisage ensuite le cas particulier des faibles teneurs, puis celui des *produits insolubles dans la liqueur d'iode.* Le mode opératoire et l'appareillage ont du être modifiés. Après plusieurs essais, on a conclu que la dissolution devait se faire dans un récipient distinct de la cellule, mais que le trans vasement des solutions devait se faire sans contact avec l'air ambiant.

M. *Riedinger* conclut que cette méthode a donné de bons résultats dans le cas particulier examiné. On pourrait s'en servir pour d'autres produits, en choisissant judicieusement le solvant à utiliser, à condition que ce solvant ne réagisse pas lui-même avec un composant quelconque du réactif de Fischer. La technique micro-analytique présentée, dérivée de la méthode de Fischer est assez fine. A condition d'observer les précautions élémentaires décrites dans l'exposé, l'appareil permet de détecter 0,02 mg d'eau (seuil de sensibilité). En fait, les écarts sur les résultats dépendent plus de l'état d'humidité des produits (hétérogénéité, hygroscopicité) que de la manipulation proprement dite. Pour chaque substance, la précision est à déterminer à partir des écarts observés sur les résultats effectivement obtenus.

Discussion

M. *Tranchant*, du laboratoire central des Poudres, demande des précisions sur le degré d'humidité du méthanol (rép. $2/10^4$) sur la manière de distiller le méthanol (rép.: sur perchlorate de magnésium). M. *Tranchant* propose pour l'obtention d'un meilleur sèchage des flacons, de les mettre au préalable dans un solvant miscible à l'eau. Enfin, il rappelle qu'il a déjà publié, il y a une dizaine d'années, à ce sujet, et présenté aux Journées d'Analyse et des Essais, une technique permettant de doser 15 à 20 p. p. m. d'eau dans une solution. Le cas du dosage de l'eau dans les gaz est évoqué.

Le Président de séance donne ensuite la parole à M. *R. Pallaud*, maître de conférences adjoint à l'E. N. S. C. P. pour exposer: «*Quelques applications des agents sequestrants à l'analyse*». La distinction entre composé chélaté et complexe est assez arbitraire. Parmi les agents chélatants, il existe une classe particulière d'agents complexants qui sont les agents sequestrants. On définira comme agent sequestrant tout agent chélatant donnant avec les métaux des complexes solubles. La stabilité des deux complexes est à peu près identique puisque les groupements qui sont directement liés à l'ion métallique central sont les mêmes. Les deux agents complexants chélatant et sequestrant, *désactivent* le métal par deux processus différents, l'un par précipitation, l'autre par sequestration. D'après Van Vitert et Fernetius, les principaux groupements qui ont des propriétés coordinantes marquées, sont, par ordre d'affinité pour les ions métalliques: énolate, amine, azo, noyau azoté, carboxylate, éther, carbonyle. M. *Pallaud* cite les propriétés des agents sequestrants, l'hydrolyse des métaux (formation progressive d'hydroxocomplexes, phènomène d'olation). Il traite de l'influence de la formation d'un chélate sur l'hydrolyse de l'eau, de la formation de complexes successifs, du cas des ions métalliques complètement coordinés, des agents

chélatants dans lesquels il existe un excès de groupement de coordination, de l'influence du p_H, de la stabilité des chélates métalliques. Parmi les applications des agents sequestrants et chélatants à la chimie analytique, les plus importantes sont: réglage de la concentration des ions métalliques, utilisation des agents chélatants comme tampon métallique.

Les principales méthodes générales de la chélatométrie peuvent se diviser en quatre groupes:

1° on détermine les constituants d'un mélange en agissant sur le p_H;
2° les méthodes d'isolement ou de précipitation, soit que l'on isole le métal cherché, soit, au contraire, que l'on élimine les ions gênants;
3° on fait appel à des agents sequestrants sélectifs afin de procéder à des séparations analytiques des cations;
4° on utilise des réactifs spécifiques.

On peut résumer les méthodes expérimentales en cinq procédés différents: dosage direct, dosage en retour, dosage par substitution, dosage alcalimétrique et méthodes diverses (formation de précipités par dosage ampèrométrique, polarographique, etc.

Les principaux indicateurs utilisés sont la murexide, l'ériochrome noir, le violet de pyrocatéchol, le tiron etc.

M. *Pallaud* prend comme exemple le dosage de la dureté de l'eau, puis donne la parole à M. *Voinovitch* pour traiter le cas du dosage direct de calcium et de magnésium en présence de fer, aluminium et titane par le sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA), ainsi que celui du zinc, du plomb, de l'aluminium.

La séance est levée à 19 heures.

Compte rendu de la séance du mercredi 8 Mars 1961

La séance est ouverte à 17 h 35 sous la présidence de M. *Crussard*, Directeur des Laboratoires de l'Institut de Recherches de la Sidérurgie (I. R. S. I. D.).

M. *Crussard* donne la parole à Madame *J. Guedon-Debras*, Ingénieur de Recherches aux Laboratoires de Chimie-Physique de la Société Française de Céramique, pour exposer: «*Analyse des minerais de fer par spectrophotométrie de flamme*».

L'analyse chimique des minerais de fer n'est pas aisée en raison du nombre de leurs constituants et de la diversité de leurs teneurs souvent déséquilibrées les unes par rapport aux autres. Dans le présent travail, la possibilité d'une analyse par spectrophotométrie de flamme de certains minerais de fer (bassin lorrain) a été étudiée. Sur la solution obtenue par une attaque sulfofluorhydrique accélérée de la matière, on a dosé sur deux prises aliquotes: calcium, magnésium, fer d'une part, et manganèse, aluminium, sodium et strontium d'autre part, directement sans aucune séparation préalable. Les perturbations d'ordre chimique habituellement apportées à l'émission spectrale de chacun de ces éléments par la présence des autres, sont supprimées grâce à l'addition de concentrations importantes d'hydroxy-8 quinoléine (oxine) dans les solutions mesurées inconnues et dans les solutions étalons, ce réactif exerçant par ailleurs un effet exaltateur très intéressant sur l'émission des raies analytiques.

Les perturbations d'ordre spectral sont pratiquement inexistantes, du fait de l'utilisation d'un appareillage extrêmement sensible qui permet de travailler avec des fentes très fines et qui, muni d'un monochromateur à réseau, possède une excellente dispersion.

Le temps de l'analyse est considérablement réduit par rapport à celui de l'analyse chimique classique. La précision est satisfaisante, l'erreur relative étant de 1 à 2% pour des teneurs de l'ordre de 30% en Fe_2O_3 et CaO.

Un mode opératoire est décrit. Il permet de doser d'une façon aisée, dans les conditions données, pour chaque élément, toutes les teneurs susceptibles d'être rencontrées dans de telles matières à condition qu'elles soient:

supérieures ou égales à:

0,20% pour Fe_2O_3,
0,04% pour CaO, SrO, Na_2O, MgO,
0,08% pour Mn_3O_4,
0,8% pour Al_2O_3;

inférieures ou égales à:

40% pour CaO et SrO,
20% pour Na_2O,
8% pour MgO.

Ces limites ne sont pas rigides et peuvent être étendues ou déplacées grâce à un autre choix des prises d'essai et des volumes de solutions analysées.

Le texte intégral de cette conférence paraîtra dans un prochain numéro de «Chimie Analytique».

M. *Crussard* félicite Mme *Guedon-Debras* pour son exposé très intéressant sur cette nouvelle méthode précise et rapide. La discussion est ouverte. Plusieurs auditeurs se renseignent sur le choix de la méthode d'attaque, sur l'influence de la présence de l'oxyde de zinc, sur le dosage du phosphore, sur le type de brûleur utilisé. A la question de M. *Crussard* sur le mécanisme des interférences, Mme *Guedon-Debras* répond que dans l'état actuel des connaissances, seules des hypothèses peuvent être émises. A ce sujet, M. *Voinovitch* fait savoir qu'un professeur russe, de Moscou, a confirmé le phénomène d'exaltation produit par l'oxine et a déjà fait une étude théorique assez avancée de ce phénomène.

M. *Crussard* remercie Mme *Guedon-Debras* et donne la parole à M. *R. Dupond*, Ingénieur Chimiste à la Raffinerie de Bourron, pour exposer: «*Applications de la Chimie Analytique à la fabrication des lubrifiants plastiques*».

La fabrication des lubrifiants plastiques ou graisses lubrifiantes évolue rapidement depuis quelques années. De nouvelles méthodes d'appréciation des lubrifiants sont proposées ou imposées aux fabricants par les utilisateurs.

Ces essais longs et coûteux sont heureusement complétés dans la pratique par des méthodes microphotographiques de contrôle des produits.

Après plusieurs années de pratique en parallèle des deux types de méthodes, le fabricant peut donner quelque idée des possibilités et des limites de la microphotographie dans le contrôle des fabrications.

En fait, seule l'étude statistique sur des produits bien déterminés peut donner à la méthode microphotographique, la sécurité qu'on est en droit d'attendre d'une méthode analytique.

De belles photos en couleur illustrent cet exposé.

M. *Crussard* félicite M. *Dupond* et ouvre la discussion.

Des questions sont posées sur les facteurs qui agissent le plus sur la longueur et l'épaisseur de la fibre, sur ce que deviennent les fibres après usage. M. *Dupond* précise que l'observation microscopique se fait sur lame porte objet, sans précautions spéciales.

La séance est levée à 18 h 50.

Buchbesprechungen

Monographs on the Radiochemistry of Elements*

Die hier angeführten weiteren Bändchen sind erschienen und können von „The Office of Technical Services — Department of Commerce — Washington 25, D. C. — U. S. A." bestellt werden:

NAS-NS-3013, *The Radiochemistry of Beryllium*, 58 Seiten, $ 0,75. Autor: *A. W. Fairhall*, Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, Washington.

NAS-NS-3015, *The Radiochemistry of Zinc*, 58 Seiten, $ 0,75. Autor: *Harry G. Hicks*, Lawrence Radiation Laboratory, University of California, Livermore, California.

NAS-NS-3016, *The Radiochemistry of Protactinium*, 80 Seiten, $ 1,00. Autor: *W. H. Kirby*, Mound Laboratory, Operated by Monsanto Chemical Company, Miamisburg, Ohio.

NAS-NS-3017, *The Radiochemistry of Iron*, 42 Seiten, $ 0,50. Autor: *J. M. Nielsen*, Hanford Laboratories, Hanford Atomic Products Operation, Richland, Washington.

NAS-NS-3020, *The Radiochemistry of the Rare Earths, Scandium, Yttrium, and Actinium*, 282 Seiten, $ 3,00. Autoren: *P. C. Stevenson* and *W. E. Nervik*, Lawrence Radiation Laboratory, University of California, Livermore, California.

NAS-NS-3018, *The Radiochemistry of Manganese*, 23 Seiten, $ 0,50. Autor: *G. W. Leddicotte*, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee. 1960.

NAS-NS-3024, *The Radiochemistry of Magnesium*, 22 Seiten, $ 0,50. Autor: *A. W. Fairhall*, Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, Washington. 1961.

NAS-NS-3027, *The Radiochemistry of Copper*, 54 Seiten, $ 0,75. Autoren: *F. F. Dyer* and *G. W. Leddicotte*, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee. 1961.

NAS-NS-3028, *The Radiochemistry of Rhenium*, 43 Seiten, $ 0,50. Autor: *G. W. Leddicotte*, Analytical Chemistry Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee. 1961.

NAS-NS-3022, *The Radiochemistry of Vanadium*, 76 Seiten, $ 0,75. Autor: *J. L. Brownlee*, Jr., Department of Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan.

NAS-NS-3029, *The Radiochemistry of Ruthenium*, 78 Seiten, $ 1,00. Autoren: *E. I. Wyatt* und *R. R. Rickard*, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

Gas Chromatography Abstracts 1959. Herausgegeben von *C. E. Knapman* und *C. G. Scott* im Auftrage der Gas Chromatography Discussion Group. IX, 164 S. London: Butterworths Scientific Publications. 1960. 42s.

Dieses Buch stellt die Fortsetzung der Abstracts aus dem Jahre 1958 dar. In 717 Kurzreferaten (122 Seiten) findet man die gaschromatographische Literatur des Jahres 1959. Schon diese Angabe zeigt, daß sich die Gaschromatographie nach wie vor einer außerordentlichen Beliebtheit erfreut. Bei der Leistungsfähigkeit dieser Methode ist dies allerdings nicht verwunderlich.

* Siehe Mikrochim. Acta [Wien] **1960**, 484, 623; **1961**, 164.

Die Referenten haben etwa 120 periodische Zeitschriften durchgesehen. Zusätzlich wurden auch die Chemical Abstracts sowie die Berichte von Fachtagungen herangezogen, um ein möglichst umfassendes Bild von der Entwicklung zu geben.

Besondere Anerkennung verdient auch dieses Mal das sehr detaillierte Sachverzeichnis, das 33 Seiten umfaßt. An Stelle einer alphabetischen Anordnung von Stichworten findet man hier eine Zusammenstellung nach übergeordneten Begriffen. Dies hat den besonderen Vorteil, daß man bereits aus den Stichworten ersieht, was auf dem nachgeschlagenen Teilgebiet gemacht wurde und welche Teilfragen bisher zur Debatte standen.

Auf Grund der wirklich mustergültigen Anordnung kann dieses Buch sehr empfohlen werden; denn es ermöglicht, die einschlägige Literatur schnell und erschöpfend aufzufinden. *G. Kainz*-Wien

Handbuch der Histochemie. Herausgegeben von *W. Graumann* und *K. Neumann*. Band VII/1: Enzyme. Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. Bearbeitet von *H. W. Deane*, *R. J. Barrnett* und *A. M. Seligman*. Mit 8 zum Teil farbigen Abb. und 4 Tabellen, VII, 229 S. Stuttgart: G. Fischer-Verlag. 1960. In Leinen gebunden DM 65,—. (Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes DM 58,—.)

Aufgabe der enzymatischen Histochemie ist es, die einzelnen Enzyme in den morphologischen Einheiten des lebenden Körpers zu lokalisieren. In dem vorliegenden Teilband werden nun alle für solche Untersuchungen notwendigen Verfahren und deren theoretische Grundlagen in erschöpfender Weise besprochen. Einer allgemeinen Erklärung der Eigenschaften der Fermente folgt eine genaue Beschreibung der Bedingungen, die für eine exakte Lokalisation der Enzymaktivität in situ notwendig sind. In weiteren Kapiteln geben die Autoren eine vollständige Übersicht über die speziellen Methoden zum Nachweis der verschiedenen Oxydoreduktasen, Hydrolasen, Transferasen und Lyasen in animalischen Geweben. Dabei werden bei jedem Verfahren die Reaktionsbedingungen, die Verläßlichkeit der Lokalisation sowie die Möglichkeit der Erhaltung des Enzyms in seiner aktiven Form kritisch besprochen.

Dieser in jeder Weise hervorragend gestaltete Handbuchartikel wird sicherlich viel dazu beitragen, daß in noch größerem Umfange Enzymuntersuchungen auf histochemischem Wege durchgeführt werden, zumal es sich jetzt schon zeigt, daß diese Art der Fermentuntersuchungen einen tieferen Einblick in den Ablauf der enzymatischen Vorgänge gibt als die bisher üblichen biochemischen Methoden. *W. Stöckl*-Wien

L. Lison: **Histochimie et Cytochimie animales.** Principes et Méthodes. 3e édition, volume I, XII, 398 p., 25 fig., volume II, 443 p., 5 fig. Paris: Gauthier-Villars. 1960. nfrs 90,—.

Dieses Standardwerk hat wesentlich zu der großartigen Entwicklung der Histochemie beigetragen und ist in allen Arbeitsstätten, die sich mit histochemischen Untersuchungen beschäftigen, so weit verbreitet, daß sich eine besondere Vorstellung erübrigt. Erwähnt sei nur, daß in der vorliegenden Neuauflage neben einer Anzahl neuer Methoden erstmals auch histochemische Reaktionen zum Nachweis funktioneller Gruppen beschrieben werden. Sehr zu begrüßen ist auch die Neuaufnahme eines eigenen Abschnittes, in dem die gebräuchlichsten Methoden mit genauer Arbeitsanweisung für die praktische Durchführung übersichtlich zusammengefaßt sind. *W. Stöckl*-Wien

Cecil L. Wilson and *David W. Wilson:* **Comprehensive Analytical Chemistry.** Volume I B. Classical Analysis. XXII, 878 p. Amsterdam-London-New York-Princeton: Elsevier Publishing Company. 1960.

In Fortsetzung des ersten Teilbandes (s. Mikrochim. Acta [Wien] **1960**, 1002) befaßt sich der vorliegende Band im ersten Abschnitt (Kapitel 7) mit der anorganischen Maßanalyse. Daran schließt sich als weiteres umfangreiches Gebiet die quantitative organische Analyse (Kapitel 8). Die Bearbeitung übernahmen auch diesmal mehrere Autoren.

Im einzelnen enthält das von *C. L. Wilson* eingeleitete Kapitel über anorganische Maßanalyse folgende Beiträge: *E. Bishop*, Theorie und Grundlagen; *W. I. Stephen*, Apparate; *Cora Ayers*, Acidimetrie und Alkalimetrie, Argentometrie; *R. J. Winterton*, Kaliumpermanganat, Kaliumdichromat, Cersulfat, sowie Jod, Natriumthiosulfat, arsenige Säure, Eisen(II) und Quecksilber(I); *J. H. Thompson*, Kaliumbromat, Kaliumjodat, Natriumhypochlorit; *H. Flaschka* und *A. J. Barnard*, jun., Titrationen mit ÄDTA; *M. Williams*, Verschiedene Reagenzien.

In theoretischer wie in praktischer Hinsicht gehen die einzelnen Abschnitte in alle wünschenswerten Einzelheiten ein, bieten damit eine gesicherte Grundlage für alle beschriebenen maßanalytischen Verfahren und zeigen in ihrer sachkundigen Klarheit die Kompetenz der Verfasser. Dem Leser wird damit die Möglichkeit zur verläßlichen Information über Leistungsfähigkeit und zweckdienliche Verwendung der Methoden, darüber hinaus aber auch viel wertvolle Anregung für seine eigene Arbeit geboten.

Das Kapitel über quantitative organische Analyse enthält nach einem kurzen einleitenden Abschnitt von *A. M. G. Macdonald* die nachstehend angeführten Beiträge: *G. Ingram*, Vorbereitung und Wägung der Proben; *R. Goulden*, Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung; *W. Kirsten*, Stickstoffbestimmung nach Dumas; *A. S. Jones*, Stickstoffbestimmung nach der Kjeldahl-Methode; *A. M. G. Macdonald*, Bestimmung der Halogene und des Schwefels in organischen Substanzen, Analyse der fluorhältigen organischen Verbindungen; *F. H. Oliver*, Direkte Mikrobestimmung des Sauerstoffs; *A. Sykes*, Bestimmung der Metalle; *G. Ingram*, Bestimmung der funktionellen Gruppen; *T. S. West*, Titrationen in nichtwäßrigen Lösungsmitteln.

Wer das reiche Schrifttum gerade auf diesem Gebiet der analytischen Chemie einigermaßen verfolgt hat, wird dessen sorgfältige, das Wesentliche und Bewährte hervorhebende Bearbeitung dankbar begrüßen. Die Verfasser haben es auf Grund eigener reicher Erfahrung verstanden, die bei Abfassung eines umfassenden Standardwerkes gebotene Vollständigkeit mit erfreulicher Übersichtlichkeit und knapper, auf die praktische Durchführung ausgerichteter Diktion zu vereinigen. Das Gebiet der organischen Elementaranalyse und der Bestimmung funktioneller Gruppen ist in neuerer Zeit durch eingehende Untersuchungen einzelner Teilvorgänge, durch die zunehmende Bevorzugung instrumenteller Methoden und durch das Bedürfnis nach noch weitergehender Rationalisierung in mancher Hinsicht in Fluß geraten. Diese Umstände finden ebenso ihre gebührende Berücksichtigung wie die Notwendigkeit der Darstellung vor allem jener Verfahren, die der Routineanalyse dienen.

Die Herausgeber sind zu dem Gelingen dieses Bandes zu beglückwünschen. Er dürfte sich — nicht zuletzt auch wegen seiner gediegenen Ausstattung — in die Zahl der unentbehrlichen analytisch-chemischen Standardwerke einreihen.

M. K. Zacherl Wien

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag in Wien, I., Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. *Michael Karl Zacherl*, Wien, XIX., Chimanistraße 21
Druck: Manzsche Buchdruckerei, Wien, IX., Lustkandlgasse 52